



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**RESISTÊNCIA PRIMÁRIA DO HIV AOS
ANTIRRETROVIRAIS E INFECÇÃO RECENTE EM
CENTROS DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA
REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-PERNAMBUCO**

ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI

RECIFE

2011

ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI



**RESISTÊNCIA PRIMÁRIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS E
INFECÇÃO RECENTE EM CENTROS DE TESTAGEM E
ACONSELHAMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO
RECIFE-PERNAMBUCO**

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical

Orientadora : Prof^a. Dra^a.Heloísa Ramos Lacerda de Melo MD, PhD

Co-orientadora : Prof^a. Dra^a Ana Maria de Brito MD,PhD

RECIFE

2011

Cavalcanti, Ana Maria Salustiano

Resistência primária do HIV aos antirretrovirais e infecção recente em Centros de Testagem e Aconselhamento da região metropolitana do Recife-Pernambuco / Ana Maria Salustiano Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2011.

149 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Heloísa Ramos Lacerda de Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Aids. 2. Resistência primária. 3. HIV. 4. Infecção recente. 5. Subtipos. I. Melo, Heloísa Ramos Lacerda de. II. Título.

616.9792

CDD (20.ed.)

UFPE
CS2011-097



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI

No dia 24 de fevereiro de 2011, às 09h00, no Auditório do Depto. de Enfermagem do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Professores: a Prof^a. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Presidente da Banca - UFPE), o Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda (UPE), o Prof. Dr. José Carlos Couto Fernandez (UFRJ), a Prof^a. Dra. Valéria Maria Gonçalves de Albuquerque (UPE) e o Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI sobre a sua Tese intitulada “RESISTÊNCIA PRIMÁRIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS E INFECÇÃO RECENTE EM CENTROS DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL”, a qual foi orientada pela Prof^a. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda

Prof. Dr. José Carlos Couto Fernandez

Prof^a. Dr^a. Valéria Maria Gonçalves de Albuquerque

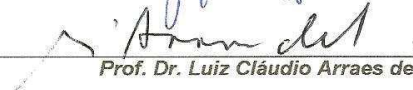
Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar

APROVADA
Aprovado (a aprovada)
Aprovado
APROVADA
Aprovado


Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda

Prof. Dr. José Carlos Couto Fernandez

Prof^a. Dr^a. Valéria Maria Gonçalves de Albuquerque

Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Tadeu Pinheiro

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

DEDICATÓRIA

*À minha mãe **Anita**,
sem a qual **nada** teria sido possível*

*À meus três “homens”:
Ruthênio Homem, Yttérbio Homem e Túlio Salustiano,
meus **amores** e companheiros de todas as horas*

*À meus irmãos **Medinha, Geninha e Toinho**,
pelo incentivo e carinho,
e em especial ao meu saudoso irmão **Luiz** (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus agradecimentos a todas as pessoas que de várias formas encontraram tempo para ajudar-me na construção desse trabalho, e que tiveram paciência e me incentivaram durante esses longos quatro anos.

Agradeço a minha orientadora Heloisa Ramos, pela dedicação, profissionalismo e paciência em todas as etapas deste trabalho. Especial e eterna gratidão devo à minha co-orientadora Ana Brito, amiga de longa data, sempre crítica e atenciosa, pela sua valiosa colaboração.

A todos os colegas do Setor de Virologia do LACEN-PE, especialmente a minha querida amiga Shirley, indispensável no desenvolvimento das atividades deste trabalho, e a Lucia e Martinha, que sempre me ajudaram na rotina laboratorial da qual tive que me afastar várias vezes.

Meu carinhoso e especial agradecimento a minha querida sobrinha e filha Daniela Salustiano, que sempre foi minha fiel colaboradora em varias etapas da minha vida profissional, desde o inicio do mestrado até a finalização desse trabalho.

Meus agradecimentos para minhas amigas Ana Cruz e Tereza Sales pela compreensão nos momentos em que tive de me afastar das atividades que a mim cabiam no Laboratório de Olinda.

Meu especial agradecimento aos colegas dos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) Kledoaldo, João Carlos, Rejane Marquim, Regineide e Daniela, que se empenharam na seleção e envio das amostras indispensáveis para esta pesquisa. Os agradecimentos são extensivos aos componentes desses serviços, assim como aos gerentes que autorizaram todo o processo desenvolvido.

Registro um especial agradecimento a François Figueiroa e a Adriana Cavalcanti, no apoio total no desenvolvimento deste trabalho desde o inicio das atividades, sem o qual não poderia ter sido concretizado.

Meus agradecimentos ao Dr. Ricardo Diaz e a Dra. Cecília Sucupira da Universidade Federal de São Paulo –UNIFESP pelas orientações, observações e revisão das sequencias.

Agradeço a todos os colegas de trabalho do LACEN-PE e do Laboratório de Olinda, pela ajuda e suporte durante todo o período do desenvolvimento desse trabalho. Esses agradecimentos são extensivos aos meus superiores e demais gerentes tanto do LACEN como do Laboratório de Olinda, os quais liberaram meus compromissos tanto quanto possível para o cumprimento desse estudo.

Meus agradecimentos a todos os professores e membros do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical, especialmente a Walter pelas orientações ao longo do curso. Obrigado também a Ulisses Montarroyos pela contribuição na análise estatística, assim como a Edjane, digitadora e revisora do banco de dados deste trabalho.

À todos os colegas da minha turma de Doutorado, em especial a Magda, Líbia, Valeria, Ana Cristina e Bebiania, meus agradecimentos pelo convívio desses quatro anos de curso.

Aos amigos e amigas, especialmente à minha numerosa família (marido, filhos, noras, irmãos, sobrinhas(os), “sobrinhos-netos”, afilhados(as), cunhadas(os),” e “agregados” que tiveram paciência e sempre estiveram me incentivando durante esses longos quatro anos!

E aos pacientes que nos ajudam silenciosamente a entender os mistérios do HIV...

MUITO OBRIGADA !

MENSAGEM

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis
E pessoas incomparáveis....*

Chico Xavier

RESUMO DA TESE

CAVALCANTI, Ana Maria Salustiano, Resistência primária do HIV aos antirretrovirais e infecção recente em Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife- Pernambuco- Brasil. 148 f. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco- Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco

O uso das drogas antirretrovirais no Brasil tem aumentado a sobrevida e melhorado a qualidade de vida dos pacientes com HIV/Aids, porém alguns indivíduos podem apresentar falha terapêutica devido a resistência do HIV, entre outros fatores. Testes genotípicos podem detectar resistência em pacientes que nunca fizeram uso da terapia, possibilitando identificar cepas resistentes que podem ser transmitidas. Ensaio imunoenzimáticos com metodologias específicas podem identificar se uma pessoa foi infectada recentemente, distinguindo-as de pessoas com infecção crônica. Esta tese é composta por uma revisão da literatura abordando resistência primária, infecção recente e subtipos do HIV, e por dois artigos. No primeiro, sob o título ***“Resistência primária do HIV aos antirretrovirais em Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) da Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco”*** foram analisadas 130 amostras de usuários soropositivos para o HIV e virgens de tratamento antirretroviral recrutados no período de julho/2007 a abril/2009, de cinco CTA. As amostras foram analisadas utilizando-se o kit TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay –OpenGene DNA Sequencing System (Siemens Diagnostics, USA) para detecção de mutações de resistência e no ensaio BED-CEIA® IgG HIV-1 (Calypse Biomedical Corporation- USA) , para identificação de infecção recente. Encontraram-se freqüências de 6,1% e de 4,6% de resistência primária segundo os critérios do International AIDS Society (IAS – USA,2009) e Surveillance Drug Resistance Mutations- SDRM-OMS-2009, respectivamente. O percentual de infecção recente foi de 23,1% nas amostras genotipadas e foram identificados 56,9% de subtipo B e 37,7% de subtipo F. Em conclusão, o achado de freqüência de resistência primária foi mais elevada do que a detectada em 2002 em Recife (2%), revelando um aumento da resistência associada aos Inibidores da Transcriptase Reversa

Não-Nucleosídeos (ITRNN). Em relação aos subtipos virais, destaca-se o alto percentual de subtipo F na Região Metropolitana do Recife, e um alto percentual de infecção recente nas amostras sequenciadas. No segundo artigo, intitulado ***“Infecção recente e prevalência do HIV em usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife - Pernambuco”*** descreve-se a taxa de infecção recente em 169 amostras de cinco CTA da RMR, a prevalência da infecção nesses CTA no período de julho/2007 a abril/2009 e as possíveis associações entre as características sócio- demográficas e laboratoriais dessa população. Observou-se um percentual de infecção recente de 23,7%, e taxas de prevalência variando de 1,2% a 3,9%. Concluímos que a infecção recente ocorre principalmente nas faixas etárias mais jovens e com maior frequência entre heterossexuais, apesar de frequência significativa entre HSH. A infecção pelo HIV-1 observada neste estudo, predominou no sexo masculino e Recife revelou-se com maior prevalência da infecção pelo HIV e com maior percentual de infecções recentes.

Palavras chave :Aids, resistência primária ,HIV, infecção recente, subtipos.

ABSTRACT

Cavalcanti, Ana Maria Salustiano, Primary resistance to antiretrovirals and HIV infection in individuals newly diagnosed recently in Counseling and Testing Centers in the metropolitan area of Recife, Pernambuco, Brazil. 148 f. Tese (PhD), Federal University of Pernambuco Center of Medical Sciences Saúde. Postgraduate Program in Tropical Medicine, .Recife.Pernambuco

The use of antiretroviral drugs in Brazil has increased survival and improved quality of life of patients with HIV / AIDS, but some individuals may fail therapy due to resistance to HIV, among other factors. Genotypic testing can detect resistance in patients who had never used the therapy, making it possible to identify resistant strains that can be transmitted. Immunoassays with specific methodologies can identify whether a person was infected recently, distinguishing them from persons with chronic infection. This thesis comprises a review of literature dealing with primary resistance, recent infection and subtypes of HIV, and two articles. At first, under the title "***Primary resistance of HIV to antiretroviral drugs in Voluntary Counseling and Testing Centers (VCT) in the Metropolitan Region of Recife (RMR), Pernambuco***" analyzed 130 samples of HIV seropositive individuals and virgin antiretroviral treatment recruited from the July/2007 April/2009, five CTA. The samples were analyzed using the kit TRUGENE ® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics, USA) for detection of resistance mutations and the BED assay Calypte ® HIV-1 for identification of recent infection. We found frequencies of 6.1% and 4.6% of primary resistance using the criteria of the International AIDS Society (IAS - USA, 2009) Surveillance and Drug Resistance Mutations-SDRM-OMS-2009, respectively. The percentage of recent infections was 23.1% in samples genotyped and identified 56.9% of subtype B and 37.7% of subtype F. In conclusion, the finding of primary resistance rate was higher than that detected in 2002 in Recife (2%), revealing an increase in resistance associated with reverse transcriptase inhibitors Non-nucleoside (NNRTI). Regarding subtypes, there is the high percentage of subtype F in the metropolitan area of Recife, and

a high percentage of recent infections in the samples sequenced. In the second article, entitled "***Infection and recent prevalence of HIV among users of Counseling and Testing Centers in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco***" describes the rate of recent infection in 169 samples of five CTA of RMR, the prevalence of infection in these CTA in the period of July/2007 April/2009 and the possible associations between sociodemographic and laboratory characteristics of this population. There was a recent infection rate of 23.7%, and prevalence rates ranging from 1.2% to 3.9%. We conclude that early infection occurs mainly in younger age groups and more frequent among heterosexuals, despite significant frequency among MSM. The infection predominates in males and Recife is the city with the highest prevalence of infection and a higher percentage of recent infections.

Keywords: AIDS, primary resistance, HIV, recent infection, subtypes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Prevalência da resistência primária no mundo.....	22
Figura 2 – Estudos sobre resistência primária no Brasil.....	25
Figura 3 – Distribuição dos subtipos do HIV-1 no Mundo.....	35
Figura 4 – Distribuição dos subtipos do HIV-1 no Brasil	37
Figura 5 – Distribuição dos subtipos do HIV-1 no Nordeste.....	38
Figura 6 – Algoritmo de testagem das amostras pelo BED-CEIA.....	50
Figura 7 - Mapa da Região Metropolitana do Recife, localização dos CTA da pesquisa e prevalência do HIV-1.....	82

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Características sócio-demográficas e laboratoriais da população estudada..... 60

Tabela 2 – Indivíduos identificados com mutações de resistência..... 61

Tabela 3 – Características sócio demográficas e laboratoriais da população estudada, segundo condição da infecção..... 62

Tabela 4 - Características sócio demográficas e laboratoriais da população estudada, por subtipo do HIV-1..... 63

ARTIGO 2

Tabela 1 - Prevalência do HIV-1 em cinco CTA localizados na região metropolitana do Recife e amostras testadas para detecção de infecção recente Período: julho/2007 a abril/2009..... 79

Tabela 2 - Prevalência do HIV-1 em três CTA localizados na Região Metropolitana do Recife, de acordo com o sexo, faixa etária e categoria de exposição Período: julho/2007 a abril/2009..... 80

Tabela 3 - Características da população segundo condição da infecção pelo HIV..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BED-CEIA	Ensaio imunoenzimático de captura BED-HIV-1
CTA	Centro de Testagem e Aconselhamento
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CD4	Marcador de superfície dos linfócitos T
CRF	Forma recombinante circulante
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
Env	Gene que codifica as glicoproteínas do envelope
ELISA	Ensaio imunoenzimático
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
Gag	Gene que codifica as proteínas estruturais
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HXB2	Isolado viral selvagem do HIV-1
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IgG	Imunoglobulina G
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeo
ITRNN	Inibidores da Transcripase Reversa Não nucleosídeo
IP	Inibidores da Protease
IAS	<i>International Aids Society</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pol	Gene que codifica a Polimerase
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PR	Protease
RNA	Ácido ribonucleico
RMR	Região Metropolitana do Recife
RP	Resistência primária
RP	Resistência secundária

RENAGENO	Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem
SDRM	<i>Surveillance Drug Resistance</i>
STARHS	<i>Serologic Testing Algorithm for Recent HIV .</i> <i>Seroconversion</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAM	Mutações associadas aos timidínicos
TR	Transcriptase reversa
TARV	Terapia antiretroviral
TDR	<i>Transmitted drug resistance</i>
UDI	Usuários de drogas injetáveis

SUMARIO

RESUMO

ABSTRACT

1. APRESENTAÇÃO.....	18
2. REVISAO DA LITERATURA.....	21
2.1. Resistência do HIV aos antirretrovirais.....	21
2.2. Detecção da infecção recente do HIV.....	30
2.3. Subtipos do HIV	35
3. PERGUNTA CONDUTORA.....	41
4. OBJETIVOS.....	42
4.1. Geral.....	42
4.2. Específicos.....	42
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5.1. Desenho do estudo.....	43
5.2. Local do estudo.....	43
5.3. População do estudo.....	43
5.4. Variáveis.....	44
5.4.1 Variáveis dependentes.....	44
5.4.2 Variáveis independentes.....	44
5.5. Operacionalização da pesquisa.....	45
5.5.1 Ensaio de genotipagem do HIV-1.....	45
5.5.2 Ensaio para detecção de infecção recente.....	48
5.6. Considerações éticas.....	51
5.7. Análise estatística.....	52
6. RESULTADOS.....	53
6.1. ARTIGO 1	
Resistência primaria do HIV aos antirretrovirais em Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife Pernambuco.....	53
6.2. ARTIGO 2	
Infecção recente e prevalência do HIV em usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife- Pernambuco.....	72

7. CONCLUSÕES.....	91
8. RECOMENDAÇÕES.....	93
9. REFERÊNCIAS.....	94
APENDICES.....	108
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido	
Apêndice B – Questionário da pesquisa	
Apêndice C – Versão em inglês do artigo 1 submetido à revista <i>AIDS Research and Human Retroviruses</i>	
Apêndice D – Versão em inglês do artigo 2 submetido à revista <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>	
ANEXOS.....	142
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE	
Anexo B – Carta de anuência do LACEN-PE	
Anexo C – Carta de anuência da Coordenação Estadual DST/Aids-PE	
Anexo D – Tabela de Mutações International AIDS Society –IAS	
Anexo E – Tabela de Mutações <i>Surveillance Drug Resistance Mutations</i>	

1. APRESENTAÇÃO

A distribuição universal das drogas antirretrovirais no Brasil tem aumentado a sobrevida e melhorado a qualidade de vida dos pacientes com HIV/AIDS.(TEIXEIRA PR, *et al*, 2004). Atualmente no Brasil, cerca de 200.000 indivíduos com HIV/Aids estão utilizando a terapia antirretroviral (TARV) de forma gratuita distribuída pelo Ministério da Saúde(<http://www.aids.gov.br>). Entretanto alguns indivíduos podem apresentar falha terapêutica devido a vários fatores, entre eles a resistência do HIV a essas drogas (DE BETHUNE & HERTOGS,2006,TOZZI V., *et al*,2006). Esta resistência pode ser verificada através de testes genotípicos os quais detectam mutações no HIV-1, e esses ensaios estão sendo utilizados na rotina laboratorial para monitoramento desses pacientes. Os testes genotípicos permitem ainda identificar os subtipos do HIV-1 através da análise das seqüências genéticas geradas pelo ensaio. O perfil de mutações do HIV associado à resistência aos antirretrovirais pode ser detectado em pacientes que nunca fizeram uso da terapia, possibilitando identificar cepas resistentes que podem ser transmitidas para indivíduos recém infectados pelo vírus (DIAZ, R.2004).

Os Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) em HIV/Aids estão presentes nos municípios que concentram 70% dos casos de aids no Brasil. Nas cidades que tem esses centros, a realização dos testes anti HIV é duas vezes maior do que nas cidades que não dispõem destes serviços. Com a implantação dos CTA no Brasil aumentou o acesso ao teste anti HIV e muitos indivíduos assintomáticos e infectados mais precocemente, estão procurando estes centros para realizar o exame (GRANGEIRO A., 2007)

Estudos moleculares nos vírus isolados das amostras de indivíduos soropositivos para o HIV diagnosticados em Centros de Testagem, que na maioria das vezes são pessoas que realizaram o teste anti HIV pela primeira vez, podem fornecer dados sobre a resistência genotípica aos antirretrovirais revelando a presença de mutações no vírus detectado, bem como possibilita a identificação de subtipos do HIV circulantes na área estudada.

Em Pernambuco existem 24 CTA distribuídos em todo estado, e na região metropolitana do Recife essas unidades de saúde estão presentes em vários municípios, incluindo os de maior porte como, Cabo de Santo Agostinho, Olinda, Jaboatão dos Guararapes, Paulista, e Recife, onde é grande o número de pessoas

que comparecem a esses serviços para realizarem o teste anti HIV. A maioria desses centros possui Serviço de Atendimento Especializado (SAE) e recebem recursos do Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (COORDENAÇÃO ESTADUAL DST/AIDS DE PERNAMBUCO, 2009).

Testes laboratoriais para detecção de infecção recente pelo HIV-1 têm sido utilizados desde 1998, quando Janssen e colaboradores padronizaram uma metodologia baseada em um algoritmo conhecido como *STARHS - Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*. Neste algoritmo, amostras de soro ou plasma positivas para a presença de anticorpos anti-HIV são analisadas em duas etapas, preliminarmente em um ensaio imunoenzimático sensível, e posteriormente em outro ensaio imunoenzimático modificado, conhecido como *Detuned-ELISA*. Amostras com resultado "reagente" no ensaio sensível e "não reagente" no ensaio menos sensível são classificadas, em relação à infecção pelo HIV-1, como amostras de infecção recente. (JANSSEN, R.S. et al,1998; HIGHLYMAN, L., 1999).

Parekh e colaboradores em 2001 desenvolveram outro método intitulado *Ensaio Imunoenzimático-BED de Captura de IgG HIV-1 (BED-CEIA - Calypte® Biomedical Corporation-USA)*, baseado na detecção de proporções crescentes de IgG específica após soroconversão. O ensaio pode determinar qual a percentagem de uma população de indivíduos infectados pelo HIV foram infectados no prazo médio de seis meses anteriores a data da coleta da amostra, desde que avaliado com os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes estudados. Utilizando-se o ensaio BED-CEIA em amostras coletadas de indivíduos usuários de CTA pode-se determinar se uma pessoa foi infectada recentemente distinguindo-as de pessoas com infecção crônica. Essa metodologia pode ser utilizada em estudos de vigilância epidemiológica em diferentes populações, como gestantes, usuários de drogas endovenosas e até em soros congelados (PAREKH BS., et al,2002; McDOUGAL JS. 2005).

A resistência do HIV aos antirretrovirais em indivíduos que nunca fizeram uso da terapia (Resistência primária), atualmente conhecida como Resistência Transmitida ou *Transmitted Drug Resistance (TDR)*, tem sido monitorada no mundo inteiro (PETERSON ML., et al,2006; GERETTI AM., 2007; CECCHERINE-SILBERTEINS F., et al., 2010). Estudos locais tornam-se de especial importância para verificar a prevalência da resistência, assim como para monitorar as estratégias

de tratamento, especialmente em indivíduos recentemente infectados, o que poderá ter um impacto na política de distribuição de medicamentos e na implantação de testes de resistência.

A presente tese está organizada em formato de dois artigos para publicação em periódicos, contendo na parte introdutória uma breve revisão bibliográfica sobre a resistência do HIV aos antirretrovirais, subtipos do vírus e detecção de infecção recente pelo HIV-1. No primeiro artigo, intitulado “**Resistência primária do HIV aos antirretrovirais em Centros de Testagem e Aconselhamento da região metropolitana do Recife-Pernambuco**”, descrevem-se a frequência de resistência primária identificada em indivíduos soropositivos para o HIV-1, diagnosticados em cinco Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) situados na região metropolitana do Recife (RMR), identificando os subtipos do HIV circulantes na área estudada.

O segundo artigo sob o tema “**Infecção recente e prevalência do HIV em Centros de Testagem e Aconselhamento da região metropolitana do Recife-Pernambuco**” descrevem-se a taxa de infecção recente e a prevalência da infecção pelo HIV-1 em CTA localizados na RMR, e as principais características sócio demográficas e laboratoriais dessa população

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS

No Brasil, cerca de 630 mil indivíduos de 15 a 49 anos vivem com HIV/Aids sendo a epidemia brasileira de aids caracterizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia concentrada, apresentando taxa de prevalência menor que 1% entre parturientes residentes em áreas urbanas, e maior que 5% em subgrupos populacionais sob maior risco para infecção pelo HIV (BARBOSA JR. A. *et al*, 2009). A taxa de prevalência da infecção pelo HIV no Brasil mantém-se estável em aproximadamente 0,6% desde 2004, e a taxa entre as mulheres é de 0,4% e de 0,8% entre os homens, na população de 15 a 49 anos. A taxa de incidência de aids vem apresentando tendência à estabilização, em patamares elevados nos últimos anos e em 2009 atingiu 20 por 100.000 habitantes, porém a faixa etária com maior incidência é a de 30 a 49 anos. Existem entretanto, grandes diferenças regionais, com declínio da taxa de incidência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, no período de 2000 a 2008, e aumento nas regiões Norte, Nordeste e Sul. (BRITO AM, *et al.*, 2000; <http://www.aids.gov.br>).

Conforme Boletim epidemiológico do Departamento DST, AIDS e Hepatites Virais (Depto./DST/AIDS/HV) do Ministério da Saúde, foram notificados 592.914 casos de aids no período de 1980 até junho de 2010. O Brasil oferece a Terapia Antirretroviral (TARV) desde 1997 de forma universal e gratuita para os portadores do vírus, e atualmente cerca de 200.000 pessoas utilizam esses medicamentos. O uso da TARV conhecida mundialmente como *HAART (Highly active antirretroviral therapy)*, reduziu a morbidade e a mortalidade causada pelo HIV, porém seu uso em longo prazo tem sido limitado pelo surgimento de resistência e toxicidade, dentre outros fatores (YOUNG *et al*, 2006, HAMMER *et al*, 2006, DE BETHUNE & HERTOGS, 2006, TOZZI *et al*, 2006). A resistência do HIV aos antirretrovirais considerada um dos principais fatores de falha terapêutica pode ser classificada em secundária e primária. A secundária emerge em consequência da seleção de mutantes em função da pressão exercida pelos antirretrovirais em indivíduos em tratamento, enquanto que a resistência primária já está presente no indivíduo

infectado antes de iniciada a terapia, possibilitando a transmissão de cepas resistentes, tornando-se um potencial problema de saúde pública (DIAZ RS., 2004).

A Resistência primária atualmente conhecida como Resistência Transmitida ou *Transmitted Drug Resistance* (TDR), tem sido monitorada no mundo inteiro (PETERSON ML., et al,2006; GERETTI AM., 2007; CECCHERINE-SILBERTEINS F., et al., 2010), e estudos locais tornam-se de especial importância para verificar a prevalência da TDR e monitorar as estratégias de tratamento, especialmente em indivíduos recentemente infectados.

O uso da monoterapia e da terapia dupla com ITRN (Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos) nas décadas de 1980 e 1990, fez com que muitos pacientes adquirissem mutações de resistência a esta classe de antirretroviral e esses pacientes agiram como doadores iniciais de transmissão de HIV resistente, na primeira fase da epidemia. Na segunda fase da epidemia, a transmissão de vírus resistentes é composta por pacientes que foram tratados nos primeiros anos da época da *HAART* e podem ter adquirido mutações de resistência aos ITRNN (Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos) e aos IP (Inibidores da Protease) (BOUCHER,C.,2006)

Vários estudos foram realizados em diferentes países para avaliar a resistência aos antirretrovirais (ARV), tanto a primária como a secundária, e os percentuais de resistência oscilam muito em diferentes localidades e para as diferentes classes de drogas. Estudos revisados por pesquisadora do Reino Unido, que inclui trabalhos da América do Sul, mostram conflitantes tendências nas diferentes coortes estudadas, onde em alguns lugares parecem ter um aumento da resistência e em outros um declínio, concluindo que a resistência é significativa nos países onde a TARV está bem estabelecida, e que os esquemas terapêuticos prescritos devem ser baseados em testes de resistência (GERETTI A.M.,2007). Figura 1

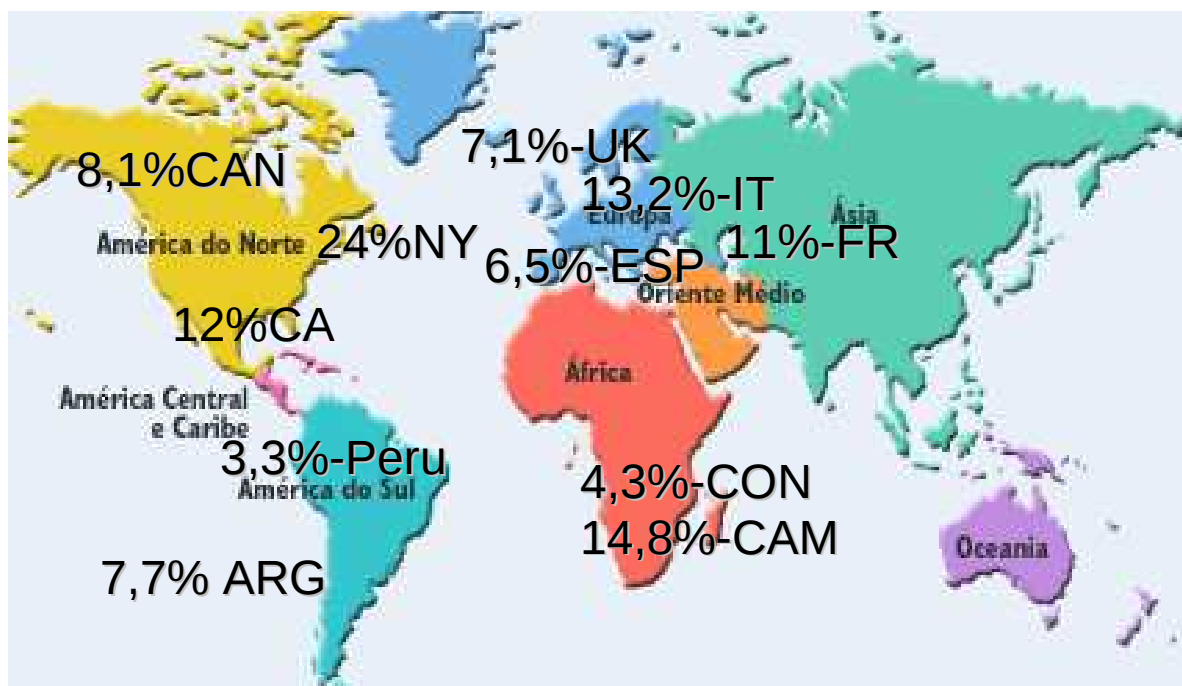


Figura 1- Prevalência da resistência primária no mundo.

Fonte: Geretti, A.M, 2007

Estudos de vigilância sobre a transmissão da resistência aos antirretrovirais na Europa e no Canadá apresentados na Conferência Internacional de AIDS (*International AIDS Society- IAS-2006*) encontraram cerca de 9% de mutações de resistência em populações de 1.050 e 2.300 indivíduos virgens de tratamento, respectivamente. Os pesquisadores canadenses também analisaram as diferenças entre pacientes infectados recentemente usando o *Detuned assay* ou *STHARS* (*Serologic testing algorithm for recent seroconversion*), e os com infecção pelo HIV já estabelecida. A prevalência de resistência em pacientes com infecção recente foi ligeiramente acima de 10% em comparação com 8% para as infecções já estabelecidas, apesar da diferença não atingir significância estatística (BOUCHER C.,2006). Meta-análise sobre resistência primária do HIV-1, apresentado neste mesmo evento, revelou que a prevalência de mutações de resistência a ITRN é consideravelmente mais baixa em coortes da África, América do Sul e Ásia, do que em coortes na Europa e EUA (BOWLES E.,2006).

Em estudo multicêntrico realizado na Alemanha de 2001 a 2003, em 269 indivíduos, foi detectada uma resistência primária de 11,2% onde a maioria das mutações foi para os ITRN e poucas mutações para ITRNN e IP, e os autores sugerem incluir o teste de genotipagem para avaliar o início da terapia (OETTE M., et al 2006). Recentemente, pesquisa publicada em 2010 por Bartmeyer e

colaboradores, em amostras de soroconvertores coletadas período de 1997 a 2007 na Alemanha, observou-se uma taxa de resistência primária de 12,4% com predominância de mutações na classe do ITRN (BARTMEYER B, et al, 2010).

Trabalho apresentado no Conferencia internacional de AIDS na África do Sul (IAS-2009) desenvolvido na Espanha em 523 indivíduos virgens de tratamento antirretroviral mostrou a presença de 6,5% de mutações associadas à resistência aos ARV, sendo 3,6% para ITRN e ITRNN e 1,5% para IP. Os autores observaram um aumento da resistência de 3,8% em 2004 para 6,5% em 2008 e um aumento de subtipos não B (GUILLLOT, et al 2009).

Pesquisa realizada em Honduras relacionado ao período de 2004 a 2007 com 196 amostras, revelou uma taxa de 6% de TDR (*Transmitted Drug Resistance*) sendo 16,6% em indivíduos recém infectados e 4,6% em indivíduos com infecção estabelecida, não encontrando mutação de resistência aos IP. Os autores utilizaram o teste BED-CEIA para identificar 12% de indivíduos com infecção recente e 88% com infecção estabelecida (MURILLO, W., et al, 2010).

Na França, Chaix e colaboradores estudando 415 indivíduos com infecção primária no período de 2005 a 2006, observaram que 11% tinham resistência a pelo menos uma droga, e 2%, a 2 ou 3 classes de drogas. O percentual por diferentes classes foi de 6% para ITRN, 5% para ITRNN e 2% para IP. Os pesquisadores observaram que em 1996 esta taxa era de 8%, aumentando para 12% no período de 2000 a 2004 e estabilizando em 11% no estudo citado, sugerindo uma estabilidade nas taxas de transmissão de resistência primária naquele país (CHAIX M.L., et al, 2009). Estudo retrospectivo mais recente realizado na região da Sicília na Itália mostrou uma taxa de resistência primaria de 15,7% em amostras coletadas no período de 2004 a 2008, com maior prevalência de mutação associada aos ITRNN. Os autores informam que houve um aumento da TDR de 18,4% para 23,5% , e uma prevalência de 10% de mutações associadas aos ITRNN (BONURA F., et al , 2010).

As tendências da resistência primária estudada por Robert Grant em São Francisco em 225 pacientes recrutados antes de qualquer tratamento no período de junho/1996 a junho/2001 revelaram que no período de 1996/1997 um percentual de 23% tinha resistência para os ITRN caindo para 7,7% de 1998/1999 e aumentando para 20% em 2001. Para os IPs a taxa de 2,5% foi observada em 96/97, subindo para 7,7% em 2000/2001, e para os ITRNN era de zero em 96/97 e aumentou para 12% em 2000/2001. Apenas um paciente apresentou resistência a todas as classes

de drogas ARV. Os autores citaram que não houve diferença entre a primeira carga viral dos indivíduos com vírus resistentes e vírus sensíveis aos ARV e que o CD4 inicial foi mais alto nos indivíduos com vírus resistentes, e concluíram que a frequência de resistência aos ITRNN está aumentando (GRANT R., et al, 2000). Pesquisa mais recente em San Francisco- USA em amostras de 372 indivíduos que na maioria era Homens que fazem sexo com Homens (HSH) foi detectada taxa de resistência primária em média de 16% no período de 2002 a 2009, entretanto quando estratificado por ano, observou-se taxas de 24% em 2005 e de 15% em 2009 (JAIN, V et al., 2010).

Na América Latina, estudos têm revelado percentuais diversos para as taxas de resistência primária: 11% na Venezuela, 3,3% no Peru, 6,4% em Cuba, em diferentes populações e metodologias (CASTILLO L., *et al*, 2009; LAMA JR., *et al*, 2006; PÉREZ L, *et al* , 2007). Na Argentina, estudo publicado em 2011 com populações de diferentes risco para a infecção pelo HIV mostrou uma taxa de resistência primária de 8,4%, observando-se taxas elevadas em usuários de drogas endovenosas (UDI) do sexo feminino(33,3%) maiores do que no sexo masculino (15,4%). Neste estudo não foi detectada resistência em gestantes e em trabalhadoras do sexo, e um percentual mais elevado em indivíduos com infecção estabelecida do que nos indivíduos com infecção recente. As mutações mais prevalentes foram: 103N relacionada com os ITRNN (44,5%), seguida da mutação 184V (33,3%) e 41L(22,2%) associadas aos ITRN (PANDO, M.A., *et al*, 2011)

Populações diversas como gestantes e crianças também estão sendo analisadas para verificar taxas de resistência primária em estudos mais recentes. Em estudo multicêntrico envolvendo amostras de crianças da Argentina, México e Brasil foi detectada uma taxa de resistência primária de 8,7% em crianças com idade média de 7 anos e virgens de tratamento ARV (SOTO-RAMIREZ, L.E., *et al*, 2010). Em Angola, em amostras de gestantes recém diagnosticadas em duas maternidades de Luanda, não foram identificadas mutações para inibidores da Protease, e apenas uma mutação para ITRN e duas para ITRNN (CASTELBRANCO, E.P, *et al*, 2010). No estado de Goiás não foi encontrada resistência primária em amostras de 35 gestantes virgens de tratamento ARV porem 16,7% de resistência secundária em 42 gestantes (CARDOSO L., et al, 2010)

No Brasil, vários estudos foram realizados para verificar a resistência primária os quais revelaram diferentes prevalências para as classes de ARV: cerca de 2%

para as três classes de ARV, 11,4% para apenas uma classe (ITRNN) e percentuais elevados de mutações secundárias para os inibidores de protease, sem presença de mutações primárias para esta classe de ARV (BRINDEIRO R., *et al.*, 2003; PEDROSO C., *et al.*, 2007; VARELA, *et al.*, 2007). Em amostras de Porto Alegre onde circula mais o subtipo C, baixos percentuais de mutações de resistência para as três classes de ARV foi observado por RODRIGUES R. e colaboradores em 2006 (2% para ITRNN, 1% para ITRN e zero para IP). Entretanto, pesquisadores de São Paulo analisando pacientes HIV positivos de CTA de Santos, detectaram resistência de 36,8% a no mínimo uma classe de ARV em indivíduos com infecção recente e 25% de resistência em pacientes com infecção crônica (SUCUPIRA C., *et al.*, 2007) Figura 2. Atualmente esses percentuais podem ser menores se forem avaliados com a lista de mutações SDRM uma vez que são retirados os prováveis polimorfismos que foram computados nas análises anteriores.

Local/ ano	Autor	N	ITRN	ITRNN	IP	Res. Prim	OBS
SP/2009	Sprinz et al	387	1,3%	4,4%	1,3%	7%	
GO/2009	Cardoso et al	97				8%/10%	# algorit.
BR/2009	Inocência et al	210				8%	<5%(2)
SP/2009	Sucupira et al	174	4%	11%	4%		5 CTAs
RJ/2007	Varella et al	72	1,4%	0	0		
BA/2007	Pedroso et al	152	9,8%	11,4%	5%		20 crian.
SP/2007	Sucupira et al	90				36,8% IR	
PE/2006	Medeiros et al	84	2,4%	0	0		
RJ/2006	Teixeira et al	27/31	22%-13%		7,9%		UDI
SP/2006	Barreto et al	342				6,3%	Doadores
RS/2006	Rodrigues et al	108	1%	2%	0		
BR/2003	Brindeiro et al	523	2%	2%	2%		

Figura 2 – Estudos sobre resistência primária no Brasil

Diversos trabalhos foram apresentados no VIII Simpósio Brasileiro de Pesquisa em HIV/AIDS-SIMPAIDS- em julho/2009 sobre resistência primária do HIV em diferentes estados brasileiros: no Rio Grande do Sul em 99 pacientes virgens de tratamento ARV (2005/2007) foi encontrado 9% de resistência, sendo detectados 2%, 4% e 3% de mutações primárias associadas aos ITRN, ITRNN e IP respectivamente; em 29 amostras do estado do Mato Grosso do Sul e 27 de Mato Grosso coletadas em 2008 e 2009, foi identificado um percentual de 12% de

mutações; em Campinas no estado de São Paulo, em 85 amostras de indivíduos não tratados foi identificado 13% de mutações primárias sendo 3,5% para ITRNN (SIMPAIDS–Livro de resumo,2009)

Estudo da UNIFESP-SP com 174 pacientes recrutados de cinco CTA do estado de São Paulo, virgens de tratamento, cujas amostras foram coletadas entre 2002/2007 foram pesquisadas mutações de várias regiões genômicas do HIV, sendo revelados 4% de mutações de resistência para ITRN, 11% para ITRNN e 4% para IP; também foi evidenciado neste trabalho 15% de resistência para uma classe de antirretroviral, 2% para duas classes e nenhum percentual para as três classes de ARV.(SUCUPIRA C., *et al*,2009).Em Goiás, Cardoso e colaboradores seqüenciando 97 amostras de indivíduos recrutadas entre 2007-2008, detectou uma resistência primária de 8% baseado nos padrões do IAS-USA e 10% nos padrões SDRM (CARDOSO L.M., *et al*.2009).

Em pesquisa realizada em 20 centros de atendimento a portadores do HIV de oito estados do Brasil, foram submetidas ao teste de genotipagem 387 amostras de indivíduos virgens de tratamento antirretroviral, coletadas no período de março a setembro de 2007. A maioria das amostras foi oriunda de indivíduos das cidades do Sul e Sudeste do Brasil e apenas a cidade de Salvador tinha amostras representativas da região Nordeste. Os autores evidenciaram uma prevalência de mutações associadas aos ITRN de 1,3%, de 4,4% de mutações para ITRNN e de 1% para IP, apresentando uma taxa de resistência primaria de 7% (SPRINZ E., *et al*,2009).

Pesquisa nacional do Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance), envolvendo seis capitais do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Brasília e Belém) realizada em 210 indivíduos recém diagnosticados e virgens de tratamento ARV, entre 2007/2008, revelou que a prevalência da resistência primaria foi diferente nas cidades estudadas. Baseada na metodologia *Threshold survey* HIV-THS-WHO (MYATT M. & BENNETT D., 2008), que indica diferentes níveis de resistência para países em desenvolvimento: prevalência alta(>15%),intermediária(5 a 10%) e baixa (<5%), as cidades de Salvador e Porto Alegre evidenciaram um percentual de <5% e o restante apresentou uma taxa intermediaria.Os autores acentuam os níveis críticos de resistência em São Paulo,

Rio de Janeiro, Belém e Brasília, e sugerem novos estudos para melhor definir os fatores de risco associados com a transmissão do HIV resistentes (INOCENCIO, L.A., et al, 2009). Em estudo nacional realizado pela mesma equipe em 2003, onde foram analisadas 535 amostras de diferentes cidades no Brasil observou-se resistência para ITRN de 2,4%, para ITRNN de 2,2% e para IP de 2,1% (BRINDEIRO R., et al, 2003)

Na região Nordeste, no estado de Pernambuco, em amostras coletadas em 2002 de 84 indivíduos recém diagnosticados para o HIV, virgens de tratamento mas cronicamente infectados e sintomáticos, foi evidenciada baixa prevalência de mutações primárias para ITRN (2,4%), nenhuma mutação para ITRNN, porém prevalência de mutações secundárias para ITRN de 20% e para IP de 78% (MEDEIROS L., et al, 2007). Entretanto no estado da Bahia, foi observada uma alta taxa de resistência primária, onde 18,9% dos indivíduos estudados apresentaram no mínimo uma mutação associada à resistência às três classes de antirretrovirais (PEDROSO C., et al, 2007). No estado do Ceará mais recentemente, em amostras de 74 indivíduos atendidos em dois hospitais daquele estado, coletadas em 2008/2009, identificou-se prevalência de resistência primária de 9,4% (ARRUDA E., et al, 2010).

Muitos estudos para investigar a resistência em indivíduos sem tratamento ARV estão sendo realizado no mundo e no Brasil, porém diferentes metodologias, populações distintas, local do estudo, entre outras variáveis, são avaliadas, tornando-se difícil a comparação entre os resultados dessas pesquisas. Trabalhos mais recentes apresentados na *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection CROI-2010*, mostra dados conflitantes em relação a tendências da TDR onde alguns pesquisadores observaram estabilidade da prevalência da TDR, outros observaram declínio, e outros aumento das taxas de prevalência da resistência primária (POON et al, 2009; BRACCIALE et al, 2009; WHEELER et al., 2010). Estudos recentes compilados por pesquisadores italianos mostraram que a prevalência da TDR varia de 5 a 18% na Europa, de 2,2% a 24% na África e 13,8% na Ásia (CECCHERINI-SILBRSTEIN et al, 2010).

A International AIDS Society –IAS desenvolveu um painel de mutações associadas com a resistência do HIV organizado por grupo de *experts* – “The Drug Resistance Mutations Group” o qual é atualizado constantemente. O painel pode contribuir na avaliação clínica dos pacientes para decisões terapêuticas baseado nos

testes de resistência genotípica em pacientes com falha aos medicamentos, e tem sido utilizado em estudos epidemiológicos sobre resistência aos ARV (JOHNSON, V.A. *et al*, 2009) (Anexo D).

Robert Shafer da Stanford University e um grupo de *experts* em estudos de resistência da OMS publicaram em 2008 um consenso para estudos epidemiológicos sobre mutações de resistência, onde enumeram princípios básicos para avaliação das mutações retirando os polimorfismos do HIV das análises, uma vez que pode haver um falso aumento da prevalência da resistência. O estudo apresenta uma lista de mutações para as três classes de ARV para os diversos subtipos do HIV em pessoas tratadas e não tratadas conhecida como SDRM- *Surveillance Drug Resistance Mutations*. Além disso o grupo disponibiliza pela Stanford University um programa para avaliar as mutações detectadas em pesquisas sobre resistência (CPR – Calibrated Population Resistance) (SHAFER R., *et al*, 2008). Em 2009, a OMS acrescentou algumas mutações em um artigo de atualização publicado por Diane Bennett intitulado “Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug Resistance: 2009 Update”, o qual é referência para estudos de resistência primária no mundo. A lista SDRM, apresenta 93 mutações incluindo 34 mutações associadas a resistência aos ITRN em 15 posições, 19 mutações associadas aos ITRNN em 10 posições e 40 mutações associadas ao IP em 18 posições, possibilitando a comparação da prevalência da resistência em diferentes períodos e regiões (BENNETT DE., *et al*, 2009) (Anexo E).

Modelo matemático foi proposto em 2008 pela OMS-CDC para ser utilizado em estudos sobre a resistência do HIV (HIV Drug resistance – HIVDR), em locais que possuem recursos limitados, chamado *Threshold survey* (HIV-THS-WHO). O método classifica a prevalência da resistência primária do HIV em três categorias: baixa prevalência, quando for encontrada taxa <5%; moderada quando se situar entre 5 a 15%; e alta prevalência da resistência quando for >15%. Pesquisas baseadas nesta metodologia podem utilizar quantidades reduzidas de amostras ($n < 50$) em virtude do alto custo dos testes laboratoriais de resistência. A OMS recomenda repetição dos estudos depois de dois anos na área onde for detectada taxa <5% e nas áreas onde a prevalência for intermediária sugere-se repetição dos estudos no ano seguinte, além da revisão dos programas de distribuição dos medicamentos. Em locais com alta prevalência, a OMS recomenda novas pesquisas acrescentando novos sítios, revisão dos *guidelines*, e realização dos testes de resistência antes de iniciar a

TARV (MYATT, M & BENNETT, DB.,2008). Em alguns países onde os índices de resistência primária são elevados, o teste de genotipagem é recomendado para indivíduos virgens de tratamento, independentemente de apresentar sintomatologia (GUIDELINES NIH, SeT, 2009; GUIDELINES EACS 2009).

No Brasil, que há 13 anos possui uma política pública para o tratamento da aids, distribuindo os ARV para grande parte dos soropositivos para HIV, pacientes que apresentam falha terapêutica realizam o teste de genotipagem pelo SUS na rede de laboratórios implantada nacionalmente conhecida com RENAGENO-Rede de Laboratórios de Genotipagem do HIV do Depto. de DST/Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde. Atualmente, as gestantes e os recém nascidos filhos de mãe soropositivas, também realizam esses testes para verificar a resistência aos ARV. Estudos mais recentes mostram percentuais de resistência primaria mais elevados em algumas áreas do Brasil (INOCENCIO, L.,2009), o que pode levar o Ministério da Saúde a rever a indicação dos testes de genotipagem para inicio da TARV. Entretanto em Pernambuco apenas um estudo de resistência primária foi desenvolvido em 2002, estimulando a pesquisadora a realizar este estudo.

2.2 INFECÇÃO RECENTE PELO HIV-1

A vigilância epidemiológica da infecção pelo HIV-1 tem se baseado em diferentes estudos para verificar as tendências da epidemia de aids no mundo inteiro. As informações epidemiológicas disponíveis são baseadas em estudos transversais de prevalência e variam de acordo com a população estudada, com as regiões, com a metodologia, variando consideravelmente dependendo das condições do estudo. Por outro lado, estudos sobre a incidência da infecção pelo HIV podem mostrar informações mais detalhadas para monitorar a epidemia, o que é crucial para a identificação de grupos de maior vulnerabilidade para a infecção e para direcionar os programas de prevenção e controle (McDOUGAL, *et al* ,2005).

A descrição do ensaio menos sensível por Janssen *et al* em 1998 foi o maior passo no desenvolvimento de métodos para detectar infecção recente para o HIV, com aplicações práticas desta metodologia para estimar incidência. (PAREKH BS,*et al*, 2010). Janssen e colaboradores padronizaram esta metodologia baseada em um algoritmo de ensaios sorológicos para a identificação de infecções recentes pelo

HIV-1. Neste algoritmo, conhecido como *STARHS - Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*, amostras de soro/plasma, positivas para a presença de anticorpos anti-HIV são analisadas em duas etapas, sendo uma delas em um ensaio imunoenzimático padrão (sensível), comercialmente disponível, e outra em um ensaio imunoenzimático modificado, conhecido como *Detuned-ELISA*, que apresenta menor sensibilidade em relação aos ensaios do tipo padrão. Amostras com resultado "reagente" no ensaio sensível e "não reagente" no ensaio menos sensível são classificadas, em relação à infecção pelo HIV-1, como amostras de infecção recente ou amostras incidentes (JANSSEN RS *et al* ,1998). Analisando painéis de amostras sequenciais de soro/plasma de soroconvertores para o HIV-1, Janssen e colaboradores estabeleceram condições ótimas do ensaio menos sensível, capazes de estimar o tempo decorrido desde a soroconversão para essas amostras conhecidas. Este tempo chamado de "período de janela de detecção" neste protocolo, foi determinado por meio de modelagem matemática, considerando-se o tempo estimado entre o último resultado "não reagente" e o primeiro resultado "reagente" das séries de amostras sequenciais dos painéis, no ensaio sensível e no ensaio menos sensível (PETERSON ML, *et al*, 2006). Este protocolo *STARHS* foi validado e tem sido utilizado como ferramenta auxiliar nas pesquisas de vigilância do HIV/Aids nos EUA para calcular estimativa da incidência do HIV (CDC-EUA, 2001).

Posteriormente, Parekh e colaboradores em 2001 desenvolveram um novo método chamado de Ensaio Imunoenzimático-BED de Captura de IgG (*IgG-Capture BED-CEIA*), baseado na detecção de proporções crescentes de IgG específica após soroconversão. Este método utiliza como antígenos, peptídeos derivados da região imunodominante da gp41, contendo seqüências dos subtipos B, E e D, representativas de múltiplos subtipos do HIV-1 (PAREKH BS. & McDOUGAL JS., 2005). O período de janela para a soroconversão neste método é de aproximadamente 160 dias, apresentando índices de sensibilidade e de especificidade para a identificação de amostras incidentes de 81,7% e 89,1, e o desempenho do método não é afetado pela diversidade do HIV-1 (PAREKH BS, 2002). O ensaio BED-CEIA é atualmente fabricado pela Calypte® Biomedical Corporation, e pode determinar qual a percentagem de uma população de indivíduos infectados pelo HIV foram infectados no prazo de seis meses a partir da data da coleta da amostra, desde que avaliado com dados clínicos e epidemiológicos dos

pacientes estudados, não sendo recomendado em rotina para diagnóstico da infecção pelo HIV (CALYPTE BIOMEDICAL CORPORATION -Oregon, USA).

O teste BED tem sido utilizado em estudos de estimativa de incidência da infecção pelo HIV permitindo calcular a taxa de novas infecções pelo HIV, porém diferentes fatores têm sido descritos como associado ao ensaio que podem superestimar a incidência pelo HIV, tais como: indivíduos que fazem uso de terapia antirretroviral, pacientes com avançada imunodeficiência, indivíduos virgens de tratamento (porém com carga viral persistentemente indetectável) e subtipos do HIV-1 (LAEYNDECKER O., et al, 2008; HAYASHIDA Y, et al, 2008). Entretanto, vários estudos estão sendo realizados baseados nesta técnica, e os autores recomendam que seja realizado o cálculo de incidência utilizando fatores de correção, a fim de evitar super estimativas de incidência (McDOUGAL J.S. et al, 2009; HARGROVE, JW., 2009; WELTE A., et al 2009).

Estudos desenvolvidos baseados na sorologia *STARHS*, em amostras de doadores de sangue para evidenciar o risco de transmissão do HIV realizados na Califórnia (EUA), identificou-se 33 pessoas recém infectadas em 281 doadores de sangue soropositivos e na Austrália, em 317 pacientes foram detectadas 114 infecções recentes utilizando o teste “*Detuned*”. Os autores australianos recomendam o uso do teste como estratégia de prevenção para identificar infecções recentes, identificando indivíduos precocemente, para interromper a transmissão viral (MACHADO DM., et al,2002; GUY PJ., et al,2005). No Brasil, Barreto C. e colaboradores estudando 341 amostras de doadores de sangue de São Paulo coletadas no período de 1998 a 2002, observou uma taxa de infecção recente de 16% utilizando a metodologia *STARHS*. O estudo revela ainda que a proporção de casos com evidência de resistência aos ARV foi significativamente maior em doadores com infecção recente (12%) quando comparados com os infectados crônicos (5%) (BARRETO CC., et al, 2006).

Trabalho realizado no Reino Unido com amostras congeladas e amostras coletadas prospectivamente de indivíduos recentemente diagnosticados com HIV, foi detectada uma taxa de infecção recente de 32% em 715 amostras utilizando a metodologia *Vironostika-STARHS* (FISHER et al,2007). Em 2005 nos Estados Unidos da América (EUA) em gestantes testadas pelo BED, foi observada uma taxa de infecção recente de 13,8% em 203 amostras, mostrando uma incidência de 2,4 por 1000/gestantes/ano (NESHEIM et al, 2005). Altas taxas de incidência e de

infecção recente foram evidenciadas em 2006 também nos EUA observando-se um percentual de 31% em 6864 amostras testadas pelo BED. A taxa de incidência de novos infectados nesse período, calculada a partir de métodos estatísticos aplicados à detecção de novos casos, foi estimada em 22,8 por 100000 habitantes, apresentando uma incidência de 22 p/100.000 habitantes em 2006. O grupo mais afetado foi os HSH, representado 53% dos novos casos, e a taxa de incidência do HIV foi sete vezes maior em negros do que em brancos (HALL *et al*, 2008).

Na Alemanha, 51% das 132 amostras testadas pelo BED no período de 2001 a 2006 foram positivas, revelando 54% de positividade para infecção recente no grupo de HSH e de 16% em outros grupos testados. Este estudo, porém tem um viés de seleção, pois a maior parte da população estudada foi de HSH (BATZING-FEIGENBAUM *et al*, 2009). Em Uganda, onde a prevalência do HIV em 2005 encontrava-se em 6%, em 1023 amostras positivas testadas no BED encontrou-se um percentual de 17% de infecção recente, observando-se uma maior associação no sexo feminino (MERMIN *et al*, 2008).

Ampla estudo recentemente publicado foi realizado na Argentina com o intuito de verificar resistência aos ARV e estimar a incidência em grupos populacionais de diferentes vulnerabilidades. A população do estudo foi recrutada de Organizações não governamentais e de um Hospital Materno Infantil no período de outubro/2006 a setembro/2008 sendo composta por trabalhadores do sexo (sex workers-SW), homem que faz sexo com homem (HSH), usuários de drogas (UD) e gestantes. Dos 12.192 voluntários testados para o HIV, 273 foram identificados como positivos, revelando-se uma maior prevalência em trabalhadores do sexo transsexuais (33%) e em HSH(10,3%), e baixa prevalência em gestantes (0,1%). Baseada na sorologia STARHS foi detectado um percentual de 21,8% de infecção recente em 262 amostras testadas. A taxa de incidência oscilou de 6,33 em HSH, de 2,15 em UD, 11,31 em transsexuais-SW e de 0,05 em gestantes (por 100 gestantes/ano) (PANDO MA., *et al*, 2011).

Estudos brasileiros também têm utilizado testes de infecção recente para estimar incidência em diferentes grupos populacionais. Em gestantes de São Paulo, cujas coletas foram realizadas de 1999 a 2002, foi detectada uma taxa de infecção recente de 17%(18/106) e uma taxa de incidência de 0,22 por gestante/ano (OLIVEIRA *et al*, 2005). Em estudo realizado em duas cidades de Santa Catarina, observou-se uma estimativa de incidência de 2,6 pessoas-ano utilizando o BED – CEIA em um total de

76 amostras testadas. Verificou-se ainda que, jovens na faixa etária de 13-23 anos apresentaram maior associação com infecção recente e que amostras identificadas como subtipo B apresentaram maior percentual de infecção recente (38%) (BRIGIDO LF., *et al*, 2007). Em outro estudo em Curitiba com um pequeno número de amostras testadas pelo BED, observou-se 25% (8/32) de infecção recente, principalmente em HSH. Diferentemente do estudo citado anteriormente, amostras identificadas como subtipo C neste estudo apresentaram percentual maior de infecção recente (63%) (FERREIRA *et al*, 2008).

Pesquisas com amostras de usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento têm sido realizadas para verificar a taxa de infecção recente nesses serviços de saúde. Bassichetto K.C. e colaboradores detectaram taxa de infecção recente de 15% em 194 amostras de soropositivos de cinco CTA de São Paulo, cujas coletas foram realizadas no período de novembro/2000 a abril/2001, utilizando o protocolo *STARHS/Vironostika*. Os autores observaram uma taxa de incidência de 0,53/100/ano, porém mais elevado no sexo masculino (0,77) do que no sexo feminino (0,22), e uma taxa de infecção recente mais acentuada em indivíduos mais jovens do sexo masculino. (BASSICHETTO, K.C., *et al*, 2008).

Artigo publicado em dezembro/2010 apresenta resultados de pesquisa realizada em três CTA do estado do Rio de Janeiro composta por 9.008 pessoas testadas para o HIV. Cerca de 42% dessa amostragem foram de indivíduos do sexo masculino e destes, 10% se denominaram HSH. A prevalência total do HIV foi de 4,8%(434), observando-se um percentual de 24,8% no grupo HSH. A detecção de infecção recente foi realizada utilizando-se o *BED-CEIA*, identificando-se 14% de positividade e uma incidência estimada em 1,68%/ano. O grupo HSH e a faixa etária de 25 a 40 anos apresentaram incidências mais elevadas: 11,96%/ano e 2,33%/ano, respectivamente (CASTRO, C.A.V., *et al*, 2010).

Na região Nordeste são raros os estudos baseados na detecção de infecção recente para o HIV relacionados a cálculos de incidência. Artigo recentemente publicado por pesquisadores do estado do Ceará com objetivo de detectar resistência primária do HIV, revelou 6,7%(5/74) de indivíduos com infecção recente identificados pelo *BED-CEIA*, em amostras coletadas no período de maio/2008 a maio/2009. Os autores relataram a presença de mutações associadas à resistência do HIV em três indivíduos com infecção recente, mas não apresentaram cálculo de incidência nesse estudo (ARRUDA, E., *et al*, 2010).

Segundo dados do Programa Estadual DST/Aids de Pernambuco, a taxa de incidência de casos de aids foi de 9,25 por 100.000 habitantes em Pernambuco no ano de 2008, porém esses resultados foram baseados nos casos notificados de aids, e não existem dados de incidência baseados em estudos de infecção recente para o HIV (Boletim Epidemiológico -Programa Estadual DST/Aids de Pernambuco, 2009). Entretanto, estudo recentemente realizado por nosso grupo de pesquisa, em fase de publicação, analisando amostras congeladas de dois CTA de Pernambuco, detectou-se uma taxa de infecção recente de 28% em 375 amostras testadas pelo BED-CEIA (LIMA,K.O.,*et al*, 2010 *in press- comunicação pessoal*).

Dessa forma, esta pesquisa objetivou detectar infecção recente em usuários de CTA de Pernambuco, recém diagnosticados como soropositivos para o HIV, utilizando a metodologia BED-CEIA.

2.3.SUBTIPOS DO HIV-1

A diversidade genética é uma das características mais importantes do HIV podendo ter implicações no entendimento da epidemia de aids, na patogênese da doença, na resistência às drogas, e no desenvolvimento de vacinas(RAMBAUT et al, 2004). As análises filogenéticas de numerosas amostras de HIV provenientes de várias localidades do mundo, permitiram estabelecer a classificação do HIV em tipos, subtipo, sub subtipos e formas recombinantes circulantes (CRF). Os dois tipos do HIV: HIV-1 e HIV-2 são diferenciados com base na sua estrutura genômica e na relação filogenética entre eles e os outros retrovírus de primatas. (ROBERTSON et al, 2000, APETREI,C., 2004).

O HIV-1 está classificado nos grupos: M (*major*), O (*outlier*) e o N (*non-M/non-O*) sendo o grupo M o mais prevalente e responsável pela epidemia de aids no mundo (JAFFE et al,1998; SIMON et al, 1998).Recentemente foi identificado um novo grupo do HIV-1 por pesquisadores franceses, sendo classificado como grupo P relacionado ao SIV dos gorilas, distinto dos outros grupos(PLANTIER, JC.,et al, 2009). O grupo M é subdividido em subtipos denominados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J, K) sendo ainda os subtipos A e F subdivididos em sub subtipos (A1, A2, A3, A4 e A5; F1 e F2). As formas recombinantes circulantes (CRF) vêm sendo descritas ao longo dos anos em diferentes partes do mundo. Para que seja classificado como CRF é necessário que um vírus recombinante seja identificado em pelo menos em

três indivíduos relacionados epidemiologicamente, e caracterizado através do seqüenciamento completo do seu genoma (<http://www.hiv.lanl.gov>).

O subtipo C é atualmente o mais freqüente no mundo, sendo responsável por 48% das infecções globais, seguido do subtipo A que predomina na África Central e tem grande participação na epidemia da Rússia. Na Europa e nos Estados Unidos o subtipo mais freqüente é o B, e no continente africano estão presentes todos os subtipos virais. A forma recombinante CRF02_AG foi considerada como a responsável por novas infecções na África Central segundo Osmanov e colaboradores descreveram em 2002 (<http://www.hiv.lanl.gov>) (Figura 3).

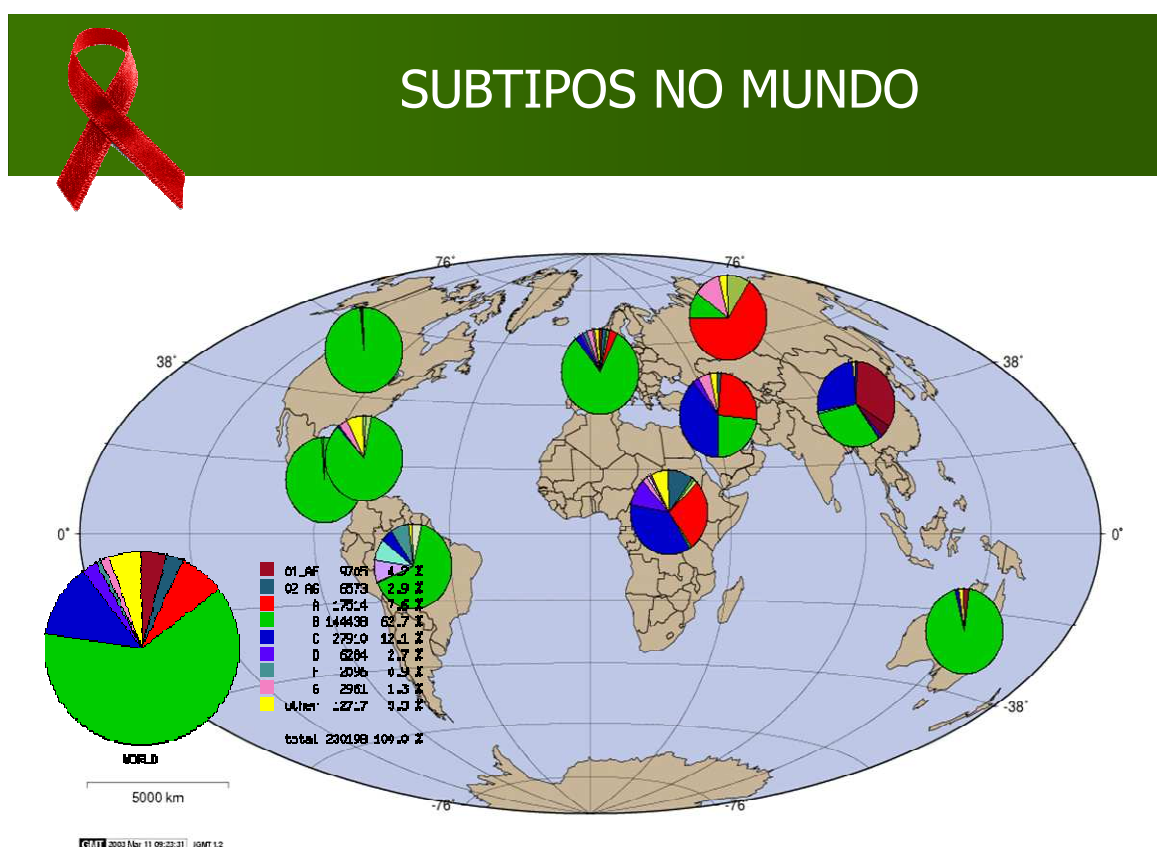


Figura 3 - Distribuição dos subtipos no mundo-Fonte: Los Alamos,2009

Os primeiros estudos sobre subtipos realizados no Brasil detectaram a presença de subtipos B e F, sendo o subtipo B mais freqüente, e ao longo do tempo, outros trabalhos revelaram a circulação dos subtipos C e D e formas recombinantes B/F e B/C (MORGADO, M.,1998; SABINO,E.1994;COUTO FERNANDEZ, JC., 1999;

TANURI, A.,1999; COUTO FERNANDEZ JC., et al, 2006; DE SA FILHO DJ., et al, 2006). A distribuição dos subtipos no Brasil vem sofrendo alterações ao longo dos anos, pois estudos com amostras do Rio Grande do Sul revelaram percentuais de 45,2% para o subtipo B, 40% para o C, 12% para o F e 3% de recombinantes.(SOARES EAJM., et al, 2003). Em 2005, Rodrigues e colaboradores observaram alta prevalência do subtipo C (58%) em amostras de indivíduos recém diagnosticados para o HIV usuários de Centros de Testagem de Porto Alegre-RS(RODRIGUES R., et al, 2006). Em estudo com 535 amostras coletadas em varias regiões do país, encontrou-se uma maior prevalência do subtipo B (64,9%), seguido dos subtipos C (22,8%) e F (11,8%). Porém, analisando a distribuição por estados observou-se acentuada prevalência do subtipo C com percentuais de 24% no Paraná e 44% no Rio Grande do Sul, enquanto em estados da região Nordeste uma maior circulação dos subtipos B e F(BRINDEIRO, R.; et al,2003). (Figura 4).

Formas Recombinantes circulantes (CRF) estão sendo identificados no Brasil por diferentes pesquisadores, principalmente em amostras das regiões Sul e Sudeste. Em 2005 foi descrito por Couto-Fernandez e colaboradores a presença da forma recombinante CRF02_AG no Rio de Janeiro (COUTO-FERNANDEZ JC, et al.,2005).Ao longo dos anos outros pesquisadores vêm identificando outras CRF principalmente em amostras de São Paulo e Rio Grande do Sul.(SABINO E et al,2006, RODRIGUES R., et al,2007;GUIMARAES ML..et al, 2008). Estudo publicado recentemente por pesquisadores do Pará revelou a introdução do CRF02_AG na região Norte do Brasil, utilizando amostras oriundas dos estados do Pará e Amapá. Este estudo também identificou os subtipos C e D naquela região.(MACHADO LF., et al,2009)

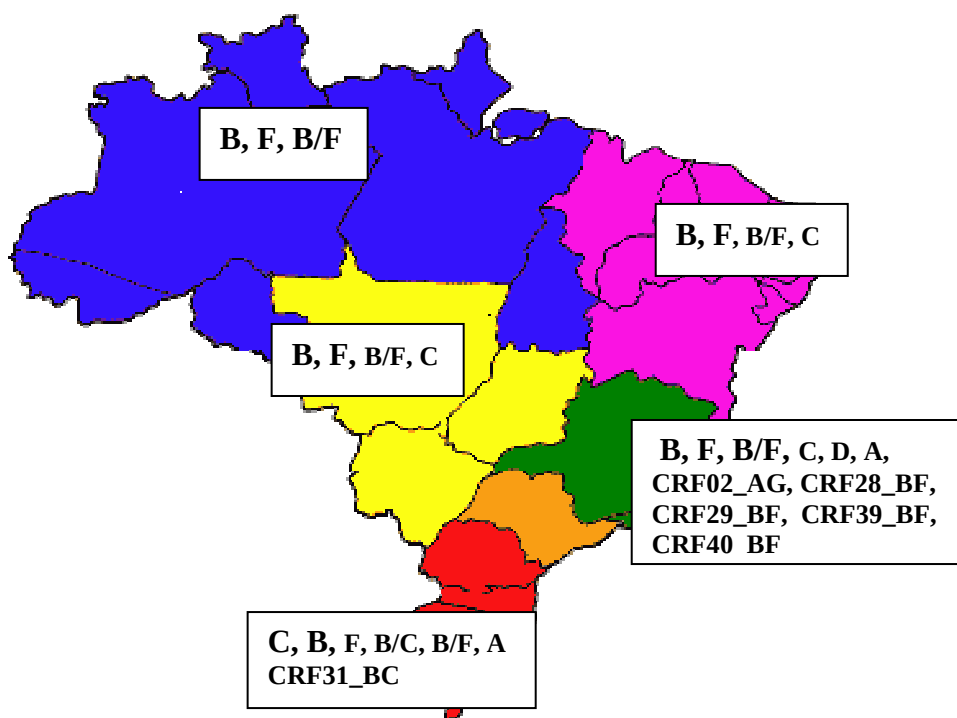


Figura 4 – Distribuição dos Subtipos no Brasil (adaptado de Couto-Fernandez, JC, 2009)

Pesquisas realizadas com amostras da região Nordeste (Bahia e Ceará) confirmaram as prevalências de 89% e 81% do subtipo B, 3% e 2,7% do subtipo F, 7,5% e 2,7% de recombinantes, respectivamente.(COUTO-FERNANDEZ, JC.,et al, 2003; GADELHA, SR., et al,2005).Em Pernambuco, em 84 amostras de pacientes com infecção crônica coletadas no período de 2002 a 2004, observou-se uma prevalência de 72,6% do subtipo B, 22,5% do subtipo F, 3,6% de recombinantes B/F e apenas um caso de subtipo C (1,2%) (MEDEIROS LB.,2006).

Estudos com amostras da Rede Nacional de Genotipagem - RENAGENO, de pacientes com falha terapêutica, mostraram prevalência do subtipo B em 70% dos casos, 12% do subtipo F e 18% de recombinantes B/F em São Paulo (RODRIGUES, R.,2005) e prevalências de 91,2% do subtipo B, 4,9% do subtipo F , 0,4% do subtipo C e 3,3% recombinantes B/F no Rio de Janeiro(COUTO-FERNANDEZ JC.,2005). Na região Nordeste, em 502 amostras também da RENAGENO coletadas entre 2002 e 2004, observou-se prevalência de 82% do subtipo B, 12% do F, 3% de recombinantes B/F, identificando-se nesta amostragem cinco casos de subtipo C e um D. (CAVALCANTI, AMS., 2007) (Figura 5)

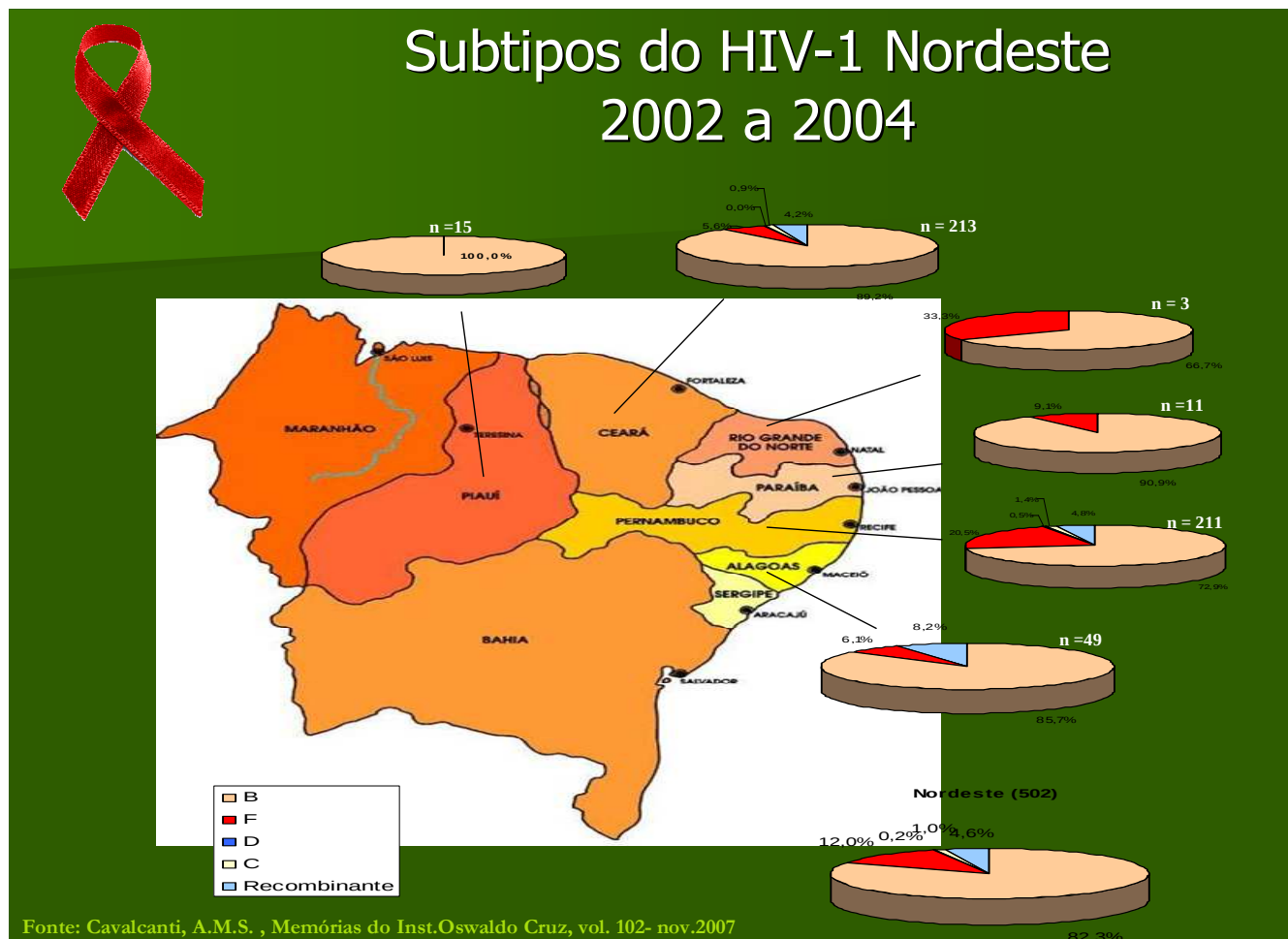


Figura 5 - Distribuição dos subtipos do HIV-1 no Nordeste

Fonte: Cavalcanti AMS., et al, 2007

Trabalhos apresentados no Simpósio de Pesquisa Básica em AIDS-SIMPAIDS/2009 mostraram mudanças substanciais dos percentuais da circulação dos subtipos no Brasil, sendo a circulação do Subtipo C mais predominante no Rio Grande do Sul, demonstrando epidemias diferentes das outras regiões do Brasil. Estudo com amostras de 2007 no RS mostraram 41% do subtipo C, enquanto do subtipo B de 26% e F de 1,1%. No Mato Grosso e Mato Grosso do Sul foi observado diferente o perfil de subtipos com amostras de 2008: B-71%, C-15%, F-6% e recombinantes 9% (SIMPAIDS,2009).

No estado de Goiás, em 97 amostras seqüenciadas foi observado 82,5% do subtipo B, seguido de 6,2% do F, 3,1% do C e 7,2% de recombinantes B/F (CARDOSO LP, et al, 2009. Estudo realizado em vinte centros que atendem pessoas com HIV/Aids de 13 cidades brasileiras, sendo a maioria do Sudeste do Brasil, revelou um percentual de 66% do subtipo B, 12,8% de subtipo C e 17% de subtipo

nãoB/nãoC em cerca de 400 amostras analisadas (SPRINZ. E., et al, 2009). Na pesquisa nacional do *Brasílian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet)* foi evidenciado um percentual de 72% do subtipo B no Brasil (5 capitais), porém no RS foi detectado 69% do subtipo C. Os autores citam a introdução do subtipo C nas outras regiões do país e uma maior percentual de CRF detectados (INOCENCIO, L., et al., 2009).

Estudos mais recentes publicados em 2010, em 293 amostras coletadas no período de 1999 a 2007 no Paraná, foram observados percentuais de 51% do subtipo B seguido de 26,5% do subtipo C, 10% do F e 8,5% de formas recombinantes (RABONI, SM., 2010). No Ceará foram identificados 85,1% do subtipo B, seguido de 8,1% e 5,4% dos subtipos F e C, respectivamente em 63 amostras coletadas entre maio/2008 e maio/2009 (ARRUDA E., et al, 2010).

Em virtude de haver poucos estudos no estado de Pernambuco com relação a circulação dos subtipos do HIV-1, levou a pesquisadora à execução deste trabalho.

3- PERGUNTA CONDUTORA

Qual a frequência da resistência primária do HIV aos antirretrovirais e de infecção recente em indivíduos com HIV/Aids residentes no Estado de Pernambuco?

4- OBJETIVOS

4.1.Geral

Verificar a freqüência de resistência primária do HIV aos antirretrovirais, a prevalência e a ocorrência de infecção recente em indivíduos com HIV/Aids, diagnosticados em Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) situados na região metropolitana do Recife, atendidos no período de julho de 2007 a abril de 2009.

4.2. Específicos

- Verificar a freqüência de resistência primaria em indivíduos diagnosticados em CTA da região metropolitana do Recife;
- Identificar as mutações associadas com a resistência aos antirretrovirais nos vírus isolados da população do estudo;
- Verificar a distribuição dos subtipos do HIV- 1 circulantes na região metropolitana do Recife;
- Comparar os dados sócio demográficos e laboratoriais dos indivíduos com resistência primaria e os subtipos virais;
- Verificar a prevalência do HIV-1 em CTA da região metropolitana do Recife;
- Identificar a freqüência de infecção recente na população do estudo;
- Comparar os grupos de indivíduos com infecção recente e crônica quanto às características sociodemograficas e laboratoriais.

5.MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

Trata-se de um corte transversal, prospectivo, realizado no período de julho de 2007 a abril de 2009.

5.2. Local do estudo

O estudo foi desenvolvido em cinco Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) situados na região metropolitana do Recife (RMR): Olinda, Paulista, Recife, Cabo de Santo Agostinho e Jaboatão dos Guararapes. O Estado de Pernambuco possui atualmente 24 CTA e os cinco centros selecionados situam-se nas maiores cidades da RMR. Os locais são de fácil acesso e grande numero de pessoas se deslocam para essas unidades de saúde para realizar o teste anti-HIV, além de receber preservativos e orientações sobre DST/Aids e Hepatites Virais, segundo as diretrizes preconizadas pelo Departamento Nacional de DST/Aids/Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

5.3.População do estudo

Usuários dos cinco CTA acima descritos, recém diagnosticados como HIV positivos, segundo as normas do Departamento Nacional de DST/Aids e Hepatites virais do Ministério da Saúde (Portarias Ministério da Saúde nº59/2003 e Portaria nº151/2009). Foram incluídos indivíduos maiores de 18 anos de idade e que não se submeteram a terapia antirretroviral (TARV), cujas amostras de sangue foram coletadas no período de julho de 2007 a abril de 2009.

5.4. Categorização das variáveis

5.4.1- Variáveis dependentes

- *Mutações associadas à resistência às três classes de ARV:*

Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRN)

Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN)

Inibidores da Protease (IP)

As mutações foram compiladas baseadas na lista de mutações da International AIDS Society- IAS-2009 e na lista Surveillance Drug Resistance Mutations- SDRM-2009 (Anexos D e E).

- *Subtipos do HIV-1:*

Os subtipos foram identificados através da análise das sequências genéticas geradas pelo ensaio TRUGENE® no formato FASTA e analisadas pelo algoritmo da Stanford University (<http://hivdb.stanford.edu>). Os subtipos foram relacionados ao grupo M do HIV-1 (A,B,C,D,F,G,H,J,K) e possíveis recombinantes.

- *Resultado da sorologia para infecção recente:*

Resultados das amostras testadas pela metodologia BED-CEIA Calypte® IgG (Calypte Biomedical Corporation- USA) de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante. Os resultados foram categorizados em Positivo (se reativo no teste) ou Negativo (se Não Reativo no teste)

5.4.2 -Variáveis independentes:

- *Características sócio-demográficos e laboratoriais:*

Sexo : masculino e feminino

Faixa etária : <25anos, de 25 a 40 anos, >40 anos

CTA de origem:Cabo, Jaboatão, Olinda, Recife, Paulista

Categoria de exposição: Heterossexual masculino (HTS masc.) Heterossexual feminino (HTS fem.), Homem que faz sexo com homem (HSH), Parceiro de HIV+

Carga viral: número de cópias /ml de sangue

Contagem de linfócitos TCD4+: número de células /ml de sangue

5.5 Operacionalização da pesquisa

Os usuários dos CTA ao retornarem para receber os resultados dos exames, foram apresentados à pesquisa e ao concordarem, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A). Amostras de sangue foram coletadas e enviadas ao Setor de Virologia do LACEN-PE para os testes de genotipagem e de infecção recente, onde foram centrifugadas, congeladas a -70°C e processadas gradativamente.

No processamento das amostras foram utilizados ensaios que estão mundialmente bem estabelecidos em Laboratórios de Biologia Molecular. Para detecção de infecção recente utilizou-se o ensaio imunoenzimático BED Calypte® IgG (Calypte Biomedical Corporation - USA); na extração do RNA viral, QIAmp®-Viral RNA-miniKit (Qiagen, Germany); e para o PCR e seqüenciamento, o TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics, USA) cujas seqüências foram analisadas pelo OpenGene® DNA Sequencing System (Siemens Diagnostics, USA). Na identificação dos subtipos virais, as seqüências genéticas geradas foram analisadas pelo algoritmo da Stanford University (<http://hivdb.stanford.edu>), e utilizou-se o SimPlot v.2 para confirmação dos subtipos e verificação de possíveis recombinantes. As amostras com padrões duvidosos foram enviadas ao Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo- (UNIFESP) para revisão. As mutações foram compiladas baseadas na lista Surveillance Drug Resistance Mutations – SDRM (BENNETT, D. *et al.*, 2009) e do painel da International AIDS Society – IAS (JOHNSON, V.A. *et al.*, 2009).

Os dados sócio demográficos dos indivíduos estudados foram resgatados do Sistema de Resultados Laboratoriais (SIREX) - Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco, instalados nos CTAs estudados, e transcritos para o questionário específico da pesquisa (apêndice B). Os resultados dos exames de carga viral e contagem de linfócitos TCD4 foram resgatados do Sistema de controle de exames laboratoriais – SISCEL do Depto. DST/Aids/HV, instalado no LACEN-PE. Relatórios do SIREX referente ao período estudado foram resgatados dos CTA participantes e compilados para análise das prevalências. Todos os dados pertinentes a pesquisa foram transcritos para questionário individual específico do projeto, digitados nos programas EpiInfo versão 6.0 (CDC-USA) em dupla entrada e em planilhas Microsoft Office Excel versão 2007 (Microsoft® Corporation, USA).

5.5.1 Ensaio de genotipagem para o HIV

O sistema de genotipagem do HIV-1 TRUGENE® - SIEMENS detecta mutações nas regiões da Transcriptase reversa (RT) e da Protease (PR) do gene *pol* do HIV através da análise das seqüências genéticas geradas pela reação de seqüenciamento, revelando evidência de resistência do vírus isolado do plasma de paciente com ou sem falha terapêutica aos antirretrovirais (TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay and OpenGene DNA Sequencing System- SIEMENS – Instruções de uso- 2008). Todas as etapas da execução dos testes foram realizadas nas áreas específicas para procedimentos de biologia molecular, segundo as boas praticas laboratoriais (BPL) seguindo rigorosamente as instruções do fabricante (Siemens Diagnostics –USA).

O procedimento da realização do teste consiste de cinco etapas:

1. Extração e purificação do RNA viral;
2. Reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT/PCR);
3. Reação de seqüenciamento CLIP®;
4. Eletroforese em gel de poliacrilamida;
5. Análise das seqüências.

Extração do RNA viral (KIT QIAamp®Viral RNA Handbook-QIAGEN):

A extração consiste em reação química onde o RNA plasmático é captado por um carreador RNA diluído em solução tampão ajustado. Após precipitação com etanol, o RNA plasmático é aderido a uma minicoluna acoplada em um tubo coletor. A coluna retém o RNA que posteriormente é lavado duas vezes com solução tampão contendo etanol absoluto, e a seguir é eluído em solução tampão ajustada e congelado a -70°C até a realização da RT/PCR.

Reação de RT/PCR:

Os RNAs extraídos foram processados na reação de RT-PCR, em baterias de 12 amostras: 10 amostras de pacientes, um controle negativo e um controle positivo que acompanha o kit, conforme descrito na bula TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics USA). Adiciona-se a cada RNA extraído mistura de

reagentes (“mixes”) contendo os iniciadores (*primers*), as enzimas, e os desoxinucleotídeos necessários para ocorrer a transcrição reversa ou seja, a transcrição da fita de RNA em DNA complementar (cDNA), e logo a seguir a amplificação deste cDNA pela reação de PCR. A mistura da reação é aquecida e resfriada a temperaturas específicas de forma a permitir que os *primers* liguem-se ao RNA alvo. Na presença de desoxinucleotídeos (dNTP) e de uma enzima RT geneticamente modificada, ocorre a formação de um híbrido RNA-cDNA. Em seguida a mistura da reação é aquecida para desnaturar este híbrido e expor as sequências de cDNA. À medida que a mistura esfria, os *primers* ligam-se à fita de cDNA e as polimerases catalizam a reação de amplificação para sintetizar uma segunda fita de DNA, produzindo uma cópia de DNA de cadeia dupla. Este processo de aquecimento e resfriamento é realizado em um termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 ou equivalente) e repetido por 36 vezes, finalizando com um produto de amplificado de DNA (*amplicon*) que é utilizado na reação de seqüenciamento.

Reação de seqüenciamento/CLIP®:

Esta reação sequencia as duas cadeias de DNA simultaneamente e para cada amostra, quatro reação CLIP são realizadas produzindo sequências de duas regiões da Protease (PR e P2) da RT (*begining e middlle*) bidirecionalmente (*sense* e *reverse*). Cada reação de seqüenciamento necessita de quatro dideoxinucleotídeos que terminam a cadeia. O *amplicon* é adicionado a uma mistura que contém todos os reagentes necessários para o prolongamento da cadeia de DNA alvo contendo os *primers sense* e *reverse* marcados com corante fluorescente, os dideoxinucleotídeos trifosfato terminais (adenosina-ddATP), (guanosina-ddGTP), (citidina-ddCTP), (timidina-ddTTP) e a enzima polimerase termoestável. À medida que a mistura da reação passa por vários ciclos térmicos, os *primers* anelam-se ao DNA alvo e são alongados, produzindo tanto as sequências *sense* como a *reverse*. A reação é realizada em baterias de seis amostras em placa de poliestireno colocada em Termociclador com as temperaturas previamente estabilizadas. São repetidos 30 ciclos e a reação é finalizada com uma solução de formamida tamponada adicionada à placa (solução stop).

Eletroforese em gel de poliacrilamida:

Os produtos da reação de seqüenciamento de cada amostra são aplicados em uma placa de vidro contendo gel de *poliacrilamida* polimerizado ultra fino. A placa é colocada em um Seqüenciador *Long-Reader Tower*® (*Siemens Diagnostics-USA*) aqui denominada “torre de seqüenciamento vertical” com solução tampão apropriada, e a seguir é aplicado um campo elétrico que força os fragmentos de DNA carregados negativamente a migrarem para o ânodo. Na parte inferior do gel, um raio laser excita o corante fluorescente ligados aos fragmentos de DNA e os detectores captam essa luz de acordo com o comprimento de onda produzido por cada corante. Em seguida, esses dados são enviados a um computador acoplado ao seqüenciador que armazena os dados de cada corrida eletroforética para avaliação pelo software do sistema.

Análise das sequencias:

As sequencias são alinhadas e comparadas automaticamente pelo software *OpenGene*® *DNA Sequencing System* (*Siemens Diagnostics, USA*) à uma sequência selvagem (*wild-type*) do HIV-1 (*HXB2 LAV-1-HIV-1*) para determinar a presença de mutações, incluindo as de resistência. Na edição, as sequencias genéticas são revisadas manualmente para confirmar as mutações e possíveis inserções e deleções. A seguir o software gera um laudo de resistência para cada amostra com a descrição das mutações associadas as três classes de antirretrovirais (ITRN, ITRNN, IP). A sequência genética do vírus isolado é armazenada no formato FASTA que é utilizado para identificação do subtipo do HIV, utilizando-se o algoritmo da Stanford University (<http://hivdb.stanford.edu>).

5.5.2 Ensaio para detecção de infecção recente

O Ensaio Imunoenzimático *BED - Captura de IgG HIV-1* (*BED-CEIA - Calypte*® *Biomedical Corporation-USA*), constitui-se em um teste ELISA de captura de IgG baseado na detecção de proporções crescentes de IgG específica para o HIV-1 após soroconversão. O ensaio é realizado em microplacas de 96 cavidades,

as quais são sensibilizadas com antígenos (peptídeos sintéticos) derivados da região imunodominante da gp41, contendo sequências dos subtipos B, E e D, representativas de múltiplos subtipos do HIV-1. O teste foi realizado em duas etapas, uma de triagem e uma confirmatória: na de triagem cada amostra foi incluída no ensaio em uma única cavidade e na etapa confirmatória, as amostras foram analisadas em triplicata a partir de três diluições independentes da amostra original. Todos os procedimentos foram realizados em conjunto com os controles positivo forte, positivo fraco, calibrador e controle negativo constantes no kit, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante (*Calypste® Biomedical Corporation-USA*). A reatividade do ensaio está relacionada à proporção de IgG no soro que é dirigida contra sequências imunodominantes da gp41 do HIV em relação à IgG total, e seu aumento relativo é expresso através da densidade óptica normalizada (GUPTA et al. 2007).

O período de janela para a soroconversão neste método é de 153 dias, empregando-se um valor de corte (*cut-off*) de 1,2 para a densidade óptica padrão (DOP). A interpretação do teste foi estabelecida da seguinte maneira:

- Interpretação triagem: todas as amostras da pesquisa foram testadas e as que obtiveram valores de Densidade Óptica(D.O) ≤ 1.2 , foram testadas em triplicadas para confirmação da infecção recente ou não.
- Interpretação confirmatório: amostras com D.O >0.8 , foram caracterizadas não recentes, antiga ou estabelecida; e as D.O ≤ 0.8 , foram caracterizadas como infecção recente.

As amostras definidas para a pesquisa encontravam-se armazenadas a -70°C e foram processadas gradativamente conforme o protocolo descrito resumidamente, a seguir:

1 - As amostras de plasma dos pacientes, calibradores, controles negativos, controles positivos alto e baixo foram inicialmente diluídos em tampão diluente numa proporção de 1:101, e uma alíquota de 100 μl destas diluições foram pipetadas nas cavidades de uma microplaca de enzimaensaio revestida com uma imunoglobulina anti-IgG humana que tem a especificidade de se ligar a IgG anti-HIV e IgG não anti-HIV, caracterizando, desta forma, um ensaio imunoenzimático competitivo.

2 - Incubou-se a placa por 60 minutos a 37°C processando-se, logo depois, sua lavagem em uma lavadora automática. A lavagem foi realizada em quatro ciclos com dispensação de 300µl por cavidade de tampão de lavagem.

3 - Adicionou-se 100µl do peptídeo HIV-1 BED diluído para 1:1001 em tampão diluente em cada cavidade. O peptídeo HIV-1 BED constitui-se de um antígeno derivado da gp41 de multisubtipos virais.

4 - Procedeu-se a nova incubação por 60 minutos a 37°C, seguido de nova lavagem da placa (semelhante ao item 2).

5 – Adicionou-se 100µl do conjugado estreptavidina diluído em 1:1001 com tampão diluente seguido de incubação de 90 minutos à 37°C; em seguida, foi realizado mais um ciclo de lavagem da placa, como descrito no item 2.

6 - Adicionou-se 100µl do substrato de tetrametilbenzidina (TMB) e procedeu-se à incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e por último, pipetou-se 100µl da solução de bloqueio (ácido sulfúrico 1N), sendo a leitura da reação realizada em leitora de densidade óptica(DO) a 450 nm.

7- Os cálculos então foram realizados utilizando-se as DO normalizadas (Don) e obtidas através das fórmulas:

$DO_{on} \text{ dos controles} = \text{mediana da DO dos controles} / \text{mediana da DO do calibrador.}$

$DO_{on} \text{ da amostra} = DO \text{ da amostra} / \text{mediana da DO do calibrador.}$

8 - Interpretação dos resultados:

$DO_{on} > 1.2 = \text{Infecção tardia.}$

$DO_{on} \leq 1.2 = \text{Repete-se o teste em triplicata para confirmação.}$

A repetição do ensaio compreende o teste confirmatório sendo realizado da mesma forma que o descrito acima, colocando-se a amostra reagente em triplicata. Na repetição do teste em triplicata, utiliza-se a mediana da DO das amostras para o cálculo da DO_{on} da amostra.

$DO_{on} > 0.8 = \text{Infecção tardia.}$

$DO_{on} \leq 0.8 = \text{Infecção recente.}$

Valores normalizados permitem melhor avaliação da variação dos resultados intra e inter-ensaios. O ponto de corte (*cut off*) de 0.8 foi selecionado por estar relacionado a resultados com uma menor taxa de classificação errônea (falso-positivos) de indivíduos com infecção tardia como infecção recente, sendo o ponto de corte do fabricante (McDOUGAL et al. 2006). A seguir, figura esquemática da interpretação dos resultados.

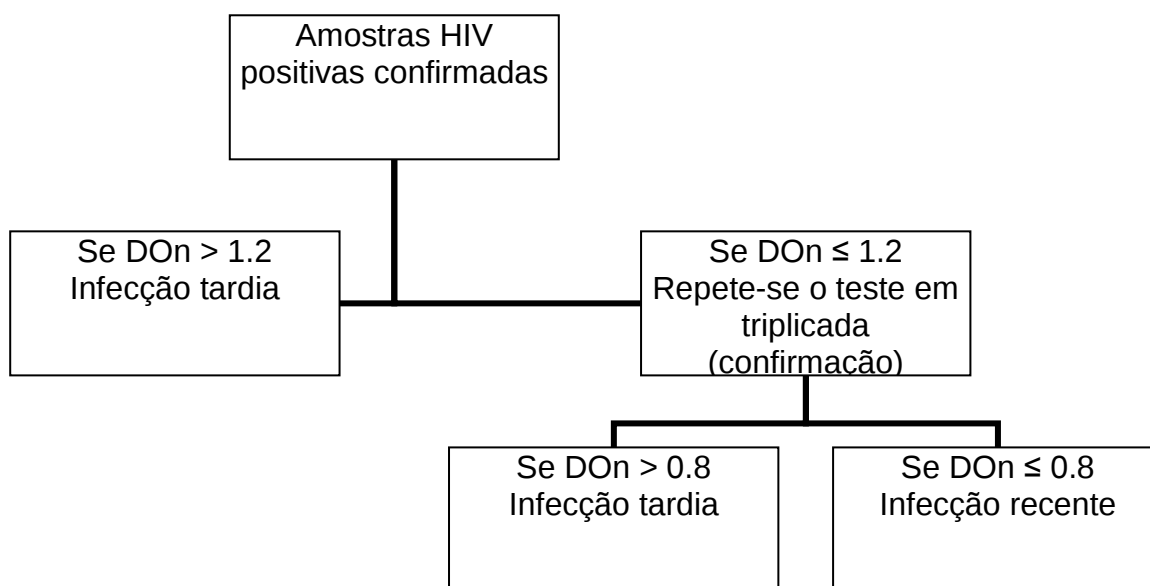


Figura 6 – Algoritmo de testagem das amostras pelo BED-CEIA

5.6 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, registro CEP/CCS/UFPE nº 120/07-SISNEP FR-134429 (Anexo A). Foram obtidas cartas de anuência da Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco que coordena as atividades gerais dos CTAs de todo o estado e do LACEN-PE onde as amostras foram processadas no setor de Virologia (Anexos B e C). Todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos sobre o conteúdo do trabalho e ao concordarem em participar, assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A)

5.7 Análise estatística

Na análise dos resultados foram utilizados os softwares: Microsoft Office Excel versão 2007 para elaboração das tabelas e na redação o Microsoft Office Word versão 2007 (Microsoft® Corporation –USA). Para o gerenciamento do banco de dados e análises estatísticas foi utilizado o software EpiInfo versão 6.04 na execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos. Para comparar as distribuições das frequências das variáveis qualitativas foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson ou o Teste exato de Fisher, e para comparação das médias foi utilizado o teste t-student. Valores menores que 0.05 (p-value <0.05) foram considerados como associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

6 . RESULTADOS

6.1. ARTIGO 1

**RESISTÊNCIA PRIMARIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS EM CENTROS DE
TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-
PERNAMBUCO**

Artigo submetido à Revista *AIDS Research and Human Retroviruses* (Apêndice C)

RESISTÊNCIA PRIMÁRIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS EM CENTROS DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-PERNAMBUCO

Ana Maria Salustiano Cavalcanti^{1,2}, Ana Maria de Brito⁴ Daniela Medeiros Salustiano^{1,2}, Kledoaldo Oliveira de Lima^{2,4}, Sirleide Pereira da Silva¹, Ricardo Sobhie Diaz⁵, Heloisa Ramos Lacerda²

Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), Setor de Virologia, Recife, Pernambuco, Brasil.^{1,2} Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ³ Centro de Pesquisas Ageu Magalhães – CPqAM- FIOCRUZ – Recife-Pernambuco – Brasil ⁴ Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) Herbert de Souza, Cabo de Santo Agostinho Pernambuco, Pernambuco, Brasil¹. Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP-SP.

Endereço para Correspondência:

Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Rua Deolinda Francisca de Souza, 217-Janga

Paulista – PE-ZIP cod- 53439-290 – e-mail:a_salustiano@yahoo.com.br

RESUMO

Investigar a resistência em indivíduos que nunca fizeram uso de antirretrovirais é importante para avaliar o potencial de resposta a esses medicamentos. Neste estudo identificou-se a frequência de resistência primária e a ocorrência de infecção recente entre indivíduos com HIV/Aids recém diagnosticados em cinco Centros de Testagem e Aconselhamento em DST/Aids da região metropolitana do Recife-Pernambuco entre 2007 e 2009. Cento e trinta amostras foram genotipadas e destas 108 foram submetidas ao ensaio BED Calypte® (Biomedical Corporation). Predominou o sexo masculino (56%) e pacientes entre 31-50 anos na população estudada. A mediana dos linfócitos TCD4+ foi de 408 cels/mm³ e da carga viral foi de 3.683 cópias/ml. A taxa de resistência primária foi 6,1% utilizando os critérios da Sociedade Internacional de Aids(IAS) e de 4,6% utilizando os critérios de Vigilância de Mutações de Resistência (SDRM) da Universidade Stanford-USA. A taxa de infecção recente foi de 23,1%. Mutações associadas à resistência aos ITRNN ocorreram em 3,84%, mutações associadas aos ITRN em 1,53% e mutações associadas aos IP representaram 0,77%. Foram identificados 57% de subtipos B, 37,7% de subtipos F, 3,1% de subtipo C e 2,3 de recombinantes B/F. A resistência primária foi mais elevada que a detectada em 2002 em Pernambuco (3,6%), com aumento da resistência associada aos ITRNN (ausente em 2002). Elevada circulação do subtipo F e alto percentual de infecções recentes na região metropolitana do Recife foram observadas, sem diferenças na prevalência de resistência nestes dois grupos.

Palavras-chave: HIV-Aids, resistência primária , genotipagem, antirretroviral

ABSTRACT

To investigate the resistance to individuals who have never made use of antiretrovirals is important for evaluating the potential response to these drugs. This study identified the frequency of primary resistance and the occurrence of recent infections among individuals with HIV / AIDS in five newly diagnosed HIV Testing and Counseling Centers for STD / AIDS in the metropolitan area of Recife, Pernambuco between 2007 and 2009. One hundred and thirty of these samples were genotyped and 108 were tested as Calypte BED ® (Biomedical Corporation). Males predominated (56%) patients between 31-50 years and the population studied. The median CD4 + was 408 cells/mm³ and viral load was 3683 copies / ml. The primary resistance rate was 6.1% using the criteria of the International AIDS Society and 4.6% using the criteria for Surveillance of Resistance Mutations at Stanford. The recent infection rate was 23.1%. Mutations associated with resistance to NNRTIs occurred in 3.84%, mutations associated with NRTI in 1.53% and mutations associated with PIs represented 0.77%. We identified 57% of subtype B, subtype F 37.7%, 3.1% subtype C and 2.3 recombinants B / F. The primary resistance was higher than that detected in 2002 in Pernambuco (3.6%), associated with increased resistance to NNRTI (absent in 2002). High circulation of subtype F and a high percentage of recent infections in the metropolitan area of Recife were observed, no differences in the prevalence of resistance in these two groups.

Keywords: HIV-AIDS, primary resistance, genotyping, antiretroviral.

INTRODUÇÃO

O Brasil oferece a terapia antirretroviral (TARV) de forma universal e gratuita para os portadores do vírus desde 1997, e atualmente cerca de 200.000 pessoas utilizam os antirretrovirais (Ministério da Saúde do Brasil, 2010). A distribuição dos antirretrovirais no país tem aumentado a sobrevida e melhorado a qualidade de vida dos pacientes com HIV/AIDS (Marins et al, 2002; Teixeira et al. 2004), porém alguns indivíduos podem apresentar falha terapêutica devido a vários fatores, entre eles a resistência do HIV a essas drogas. Devido a sua importância, a resistência em indivíduos que nunca fizeram uso da terapia (Resistência Primária - RP), atualmente conhecida como Resistência Transmitida ou *Transmitted Drug Resistance* (TDR), tem sido monitorada no mundo inteiro (Peterson ML., et al, 2006; Geretti AM., 2007; Ceccherine-Silberteins F., et al., 2010). O risco de um vírus transmitido ser resistente a pelo menos um antirretroviral apresenta uma diferença marcante na sua prevalência, podendo variar de 2,2 a 24%. Esta variação está relacionada, em grande parte, às diferenças no acesso à terapia (universal *versus* limitada), ao comportamento de risco e adesão dos indivíduos à terapia (Paredes et al. 2010). Nos EUA e na Europa a prevalência de resistência é de 5 a 18%, 13,8% na Ásia, e de 2,2 a 24% na África (Ceccherini-Silberstein et al. 2010), porém existem variações na tendência da resistência transmitida, com estudos mostrando estabilidade (Chaix et al, 2009), crescimento (Wheeler et al. 2010) ou declínio (Bracciale et al. 2009). No Brasil é variável a prevalência da RP dependendo da região estudada e estudos locais podem ter grande importância para determinar a prevalência de resistência em pacientes virgens de antirretrovirais, evitando conclusões errôneas e suas consequências.

No Brasil, os Centros de Testagem e Aconselhamento em HIV/Aids (CTA) estão presentes nos municípios que concentram 70% dos casos de aids. Nas cidades que tem esses centros, a realização dos testes anti HIV é duas vezes maior do que nas cidades que não dispõem destes serviços. Com a implantação dos CTA no Brasil, aumentou o acesso ao teste anti HIV, e muitos indivíduos soropositivos assintomáticos têm procurado estes centros em estágios iniciais da infecção para saber seu *status* sorológico (Grangeiro, 2007). Investigar a epidemiologia molecular do HIV em amostras de indivíduos diagnosticados em CTA pode ser de fundamental

importância na compreensão de cada epidemia localizada em uma determinada região do país.

Recife é a capital do Estado de Pernambuco situado na região Nordeste do Brasil, sendo sua área urbana habitada por cerca de 3,6 milhões de pessoas (7,4 milhões no estado de Pernambuco). Esta região é considerada menos desenvolvida do que as regiões Sudeste e Sul do país e está experimentando uma crescente prevalência da infecção pelo HIV e com maiores taxas de mortalidade relacionada à aids em comparação com as regiões do sul.(www.aids.gov.br) Em Pernambuco existem 24 CTA, e os selecionados para a pesquisa estão localizados em pontos estratégicos na Região Metropolitana do Recife (RMR), pois possuem uma grande demanda para o teste anti-HIV. A maioria desses serviços possui ambulatórios especializados apoiados com recursos do Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil(Coordenação Estadual DS/Aids-Pernambuco, 2010).

Os objetivos deste estudo foram: descrever a frequência de resistência primária e de infecção recente em indivíduos soropositivos para o HIV-1, recém-diagnosticados em cinco Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) situados na região metropolitana do Recife; comparar as características dos indivíduos com infecção recente e infecção estabelecida; verificar a circulação dos subtipos do HIV-1 e prevalência de mutações de resistência aos antirretrovirais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os usuários do CTA selecionados para este estudo (Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista e Recife) foram diagnosticados como HIV-positivo por dois diferentes ensaios ELISA e um teste confirmatório (Imunofluorescência ou Western Blot). Ao retornarem a esses centros para receber os seus resultados, eles foram informados sobre o estudo durante o aconselhamento pós-teste. Aqueles que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e foram submetidos a coleta de sangue para a caracterização molecular do HIV (genotipagem) e detecção de infecção recente. As amostras foram enviadas para o Setor de Virologia do LACEN-PE e armazenadas a -70°C, acompanhadas do formulário específico do projeto.

Entre julho de 2007 e abril de 2009, 210 amostras foram coletadas em indivíduos que foram recentemente diagnosticados com o HIV-1 e nunca havia recebido tratamento antirretroviral. Destas, 130 amostras de plasma tiveram uma fração do HIV-1 sequenciada. O genoma viral de RNA foi extraído usando o QIAmp® minikit RNA (Qiagen, Alemanha). Para a transcrição de RNA para DNA, amplificação por PCR e o sequenciamento genético do produto, foi utilizado o ensaio TRUGENE® genotipagem do HIV-1 (Siemens Diagnostics, EUA). Este ensaio de genotipagem detecta mutações do genoma do HIV da protease (códon 1-99) e da transcriptase reversa (códon 10-297), seqüências genéticas da região *pol*. As sequências geradas foram analisados utilizando o OpenGene® DNA Sequencing System (Instruções de uso do ensaio, 2008-Siemens Diagnostics, EUA). As mutações de resistência aos anti-retrovirais e os subtipos foram submetidos ao banco de dados da Stanford University HIV Drug disponível em <http://hivdb.stanford.edu> e os subtipos foram confirmados pelo Simplot versão 2.10 (Lole et al,1999). As mutações foram compilados com base nas listas elaboradas pelo IAS (Johnson et al, 2009) e SDRM (Bennett et al, 2009) que exclui os polimorfismos comuns na avaliação da resistência transmitida do HIV aos antirretrovirais. O ensaio BED-Calypte® foi realizado de acordo com as instruções do fabricante para diferenciação sorológica entre infecções recentes (RS) e infecções crônicas ou de longa data (LTS). (Instruções de uso do ensaio, 2008-Calypte Biomedical Corporation,USA) .

Os dados sócio-demográficos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos a partir dos registros nos CTA e enviados ao Setor de Virologia do Laboratório de Saúde Pública de Pernambuco-LACEN-PE, com base no histórico do usuário fornecido pelo SIREX- Sistema de resultados de exames laboratoriais. A carga viral e a contagem de linfócitos TCD4+ foram obtidas a partir do SISCEL (Sistema de controle de exames laboratoriais). Todos os dados relevantes dos indivíduos arrolados no estudo foram transcritas para questionário específico do projeto e digitados em dupla entrada no programa EpiInfo versão 6,0 e software para o Microsoft Office Excel v. 2007. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (protocolo CEP/CCS/UFPE.nº120/07).

RESULTADOS

No total, foram seqüenciadas 130 amostras coletadas dos CTA dos municípios: Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista e Recife no período de julho de 2007 a abril de 2009, conforme distribuição indicada na (Tabela 1). Das amostras genotipadas, foram testadas 108 amostras no ensaio de infecção recente, e obteve-se um percentual de positivos de 23,1%. A frequência de resistência primária foi de 6,1% baseada pela Tabela de mutações do IAS-2009, e de 4,6% quando baseada no SDRM-2009. O Subtipo B foi o mais prevalente (56,9%) na população estudada, seguido do subtipo F (37,7%), de 3,1% do subtipos C e de 2,3% dos recombinantes B/F. Os dados sócio demográficos e laboratoriais encontram-se descritos na Tabela 1.

As mutações associadas à resistência aos inibidores da Transcriptase reversa e aos inibidores da Protease encontradas nos oito pacientes do estudo estão discriminadas na tabela 2, acompanhadas dos dados sócio-demográficos e laboratoriais.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ao compararmos as características da população com infecção recente com a população com infecção crônica, segundo as variáveis sócio-demográficas e laboratoriais(Tabela 3). Ao analisarmos as características da população de acordo com os subtipos revelados na pesquisa, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 4)

Tabela 1. Características sócio-demográficas e laboratoriais da população estudada.

Características	Total	Indivíduos com resistência primária			
		IAS		SDRM	
Total	130	8	(6,1%)	6	(4,6%)
Faixa etária					
Menor de 30 anos	57 (43,8%)	5	(62,5%)	5	(83,3%)
31 a 50 anos	65 (50,0%)	3	(37,5%)	1	(16,7%)
51 ou mais	8 (6,2%)	-	-	-	-
Sexo					
Masculino	69 (53,1%)	5	(62,5%)	5	(83,3%)
Feminino	61 (46,9%)	3	(37,5%)	1	(16,7%)
CTA de origem					
Recife	12 (9,2%)	-	-	-	-
Olinda	9 (6,9%)	-	-	-	-
Paulista	27 (20,8%)	2	(25%)	2	(33,3%)
Jaboatão	28 (21,5%)	2	(25%)	1	(16,7%)
Cabo	54 (41,5%)	4	(50%)	3	(50,0%)
Categoria de exposição*					
HSH	21 (16,2%)	1	(50%)	1	(50%)
HTS/masculino	46 (35,3%)	4	(50%)	4	(50%)
HTS/Feminino	52 (40,0%)	2	(66,7%)	1	(33,3%)
Parceiro(a) HIV+	11 (8,5%)	1	(100%)	-	-
Subtipo do HIV					
B	74 (56,9%)	6	(75%)	5	(83,3%)
F	49 (37,7%)	2	(25%)	1	(16,7%)
C	4 (3,1%)	-	-	-	-
BF	3 (2,3%)	-	-	-	-
Infecção recente**					
Positivo	25 (23,1%)	1	(25%)	2	(50%)
Negativo	83 (76,9%)	3	(75%)	2	(50%)
CD4(em cels/ml)***					
Mediana	408	470		428	
Intervalo interquartilico	195 – 693	332 – 544		256 – 635	
Carga viral (em cópias/ml)***					
Mediana	3.683	17.671		53.259	
Intervalo interquartilico	208 – 24.224	4.095 – 67.776		20.947 – 179.220	

HTS: Heterossexual HSH: Homem que faz sexo com homem

* As respostas não são mutuamente excludentes

** 22 amostras não testadas (16,9%), dessas, 3 pacientes tiveram resistência primária pelo IAS e 2 paciente pelo SDRM

*** 34 pacientes sem informação da contagem de linfócitos TCD4 e carga viral

Tabela 2. Indivíduos identificados com mutação de resistência

CTA- Amostra	Sexo	Idade	Categoria de Exposição	Sub tipo	Mutações			Infecção recente	CD4/ Carga viral
					ITRN	ITRNN	IP		
Cabo-24913	F	25	Parc. HIV+	B	-	108I*	-	-	480/1.093
Cabo-29524	M	27	HSB	F	-	103N	-	NEG	-
Cabo-14149	M	26	HTS	B	184V	101E, 190S	-	POS	-
Cabo-93	M	32	HTS	B	184V, 215F, 219N	103N, 106I, 230L	-	POS	566/470000
Jaboatão- 36720	F	45	HTS	F	-	108I*	-	NEG	460/1.754
Jaboatão- 37415	M	30	HTS	B	-	-	46I, 73S, 82A, 90M	NEG	842/82.294
Paulista- 14785	M	47	HTS	B	-	190A	-	-	155/11.119
Paulista- 16350	F	32	HTS	B	-	225H	-	-	290/24.224

NEG – Negativo; POS – Positivo.

* Mutação relacionada à resistência apenas na classificação do IAS

Tabela 3. Características sócio demográficas e laboratoriais da população estudada, segundo condição da infecção

Características	Infecção recente		Infecção crônica		p-valor
	N	%	n	%	
Total (n = 108)	25	23,1	83	76,9	
Faixa etária					
Menor de 30 anos	14	56,0	37	44,6	0,572
31 a 50 anos	10	40,0	40	48,2	
51 ou mais	1	4,0	6	7,2	
Sexo					
Masculino	18	72,0	42	50,6	0,060
Feminino	7	28,0	41	49,4	
CTA de origem					
Recife	5	20,0	7	8,4	0,117
Olinda	-	-	8	9,6	
Paulista	3	12,0	21	25,3	
Jaboatão	4	16,0	16	19,3	
Cabo	13	52,0	31	37,3	
Subtipo do HIV					
B	15	60,0	44	53,0	0,796
F	8	32,0	35	42,2	
C	1	4,0	2	2,4	
BF	1	4,0	2	2,4	
Categoria de exposição*					
HSH	7	28,0	11	13,3	0,159
HTS/Masculino	10	40,0	30	36,1	
HTS/Feminino	6	24,0	38	45,8	
Parceiro(a) HIV+	2	8,0	4	4,8	
Resistência primária (IAS/SDRM)					
Sim	2	8,0	3	3,6	0,327
Não	23	92,0	80	96,4	
Mutações principais					
ITRN					
Sim	2	100%	-	-	-
Não	-	-	3	100%	
ITRNN					
Sim	2	100%	2	66,7%	-
Não	-	-	1	33,3%	
IP					
Sim	-	-	1	33,3%	-
Não	2	100%	2	66,7%	
CD4 (em cels/ml)					
Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	470 (157 – 962)		384 (204 – 670)		0,275
Carga viral (em cópias/ml)					
Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	795 (230 – 27349)		7724 (297 – 28895)		0,498

* As respostas não são mutuamente excludentes

Tabela 4. Características sócios demográficas e laboratoriais da população estudada, por subtipo do HIV-1

Características	Subtipos								p-valor*
	B		F		C		BF		
	(n = 74)		(n = 49)		(n = 4)		(n = 3)		
	n	%	n	%	n	%	N	%	
Faixa etária									
Menor de 30 anos	32	43,2	22	44,9	1	25,0	02	66,7	0,580
31 a 50 anos	39	52,7	23	46,9	2	50,0	01	33,3	
51 ou mais	3	4,1	4	8,2	1	25,0	00	0,0	
Sexo									
Masculino	43	58,1	24	49,0	2	50,0	00	0,0	0,418
Feminino	31	41,9	25	51,0	2	50,0	03	100	
CTA de origem									
Recife	9	12,2	3	6,1	-	-	-	-	0,803
Olinda	4	5,4	3	6,1	1	25,0	01	33,3	
Paulista	16	21,6	9	18,4	1	25,0	01	33,3	
Jaboatão	15	20,3	11	22,4	1	25,0	01	33,3	
Cabo	30	40,5	23	46,9	1	25,0	00	0,0	
Categoria de exposição									
HSH	12	16,2	09	18,4	-	-	-	-	0,632
HTS/Masculino	31	41,9	15	30,6	01	25,0	-	-	
HTS/Feminino	26	35,1	22	44,9	02	50,0	03	100	
Parceiro(a) HIV+	05	6,8	03	6,1	01	25,0	-	-	
Resistência primária									
IAS	6	8,1	2	4,1	-	-	-	-	0,607
SDRM	5	6,8	1	2,0	-	-	-	-	0,446

* Comparação entre os subtipos B e F

DISCUSSÃO

A prevalência de resistência primária aos antirretrovirais observada neste estudo foi de 4,6% quando se utiliza os critérios SDRM, que excluem polimorfismos comuns.(Bennett, D., et al 2009). Devido ao alto custo do monitoramento da resistência antirretrovirais por meio dos testes de genotipagem, a Organização Mundial de Saúde recomenda que a vigilância da resistência em pequenas áreas geográficas, deve ser estratificada, com a aplicação de um método de amostragem seqüencial chamado THS-HIV-Threshold Survey (limiar de resistência do HIV), possibilitando o uso de um pequeno numero de amostras ($n < 50$).Este método classifica a resistência primaria do HIV em três categorias: baixa ($\leq 5\%$), moderada (5-15%) e alta ($\geq 15\%$) prevalências.(Myatt M.,et al,2008).

No Brasil, dois grandes estudos sobre a prevalência de resistência primária do HIV foram publicados em 2009. O primeiro estudo foi composto de 400 participantes de 13 cidades brasileiras, porem apenas uma cidade da região nordeste (Salvador), foi localizado fora das regiões Sul e Sudeste, sendo que 220 amostras foram originárias do estado de São Paulo (Sprintz et al.,2009). Nesse estudo, utilizando os critérios do IAS, a prevalência de indivíduos com o vírus que apresentaram mutações de resistência foi de 5,7%. No presente estudo, com amostras da Região Metropolitana do Recife, a prevalência da resistência observada foi de 6,1% utilizando os critérios semelhantes aos revelados por Sprintz e colaboradores.

Avaliação realizada em nível nacional pela Rede Nacional para a Vigilância da Resistência às Drogas no Brasil (HIV-BResNet) publicado em 2009, que incluiu 210 indivíduos recém-diagnosticados de seis capitais do Brasil, dos quais duas foram da região Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), uma no Sul (Porto Alegre), uma no Centro-Oeste (Brasília), uma no Norte (Belém) e uma no Nordeste (Salvador). Neste estudo, 8,1% das amostras continha mutações de resistência, classificadas de acordo com a lista de mutações SDRM. Os níveis de resistência em São Paulo, Rio de Janeiro e Belém foram intermediários (entre 5 e 15%), enquanto os níveis foram baixos ($< 5\%$) em Brasília, Porto Alegre e Salvador.(Inocência L.,et.al, 2009). Utilizando os critérios SDRM, o presente estudo mostrou que 4,6% das amostras tinham mutações de resistência, coincidindo com a

prevalência de baixa resistência que tem sido detectada fora da região sudeste, considerada o epicentro da epidemia do HIV no Brasil. Entretanto, mesmo com níveis considerados baixos, a prevalência da resistência às drogas parece ter aumentado no estado, pois a taxa encontrada neste estudo foi um pouco maior do que a detectada em Pernambuco em 2002, que foi de 3,6%(Medeiros L.,2006).

Na região Nordeste, os estados da Bahia e do Ceará tem publicado dados recentes de resistência aos medicamentos. O estudo HIV BRestNet mostrou que Salvador apresentou uma baixa taxa de resistência a drogas, ou seja, menos de 5%. Estudo realizado no Ceará encontrou uma taxa intermediária de resistência (9,5%), que foi superior nos dois principais estudos brasileiros que incluíram os estados fora da região sudeste (Inocêncio L., et.al,2009; Arruda E., et al,2010). Considerando-se as diferenças encontradas entre os estudos, bem como as semelhanças e da proximidade das três capitais do nordeste, é preciso determinar com precisão a composição das populações em cada estudo. Note-se que a amostra do presente estudo foi exclusivamente de indivíduos recrutados em CTA recém diagnosticados com HIV apresentando uma prevalência de infecção recente de 23%, o que pode refletir mais fielmente o percentual de vírus circulando na população infectada pelo HIV nesta região. Pode-se considerar a possibilidade de que diferenças reais na prevalência da resistência podem ocorrer, visto que existem variações intra regionais.

A análise das mutações no presente estudo, utilizando os critérios SDRM, mostrou que 3,84% das mutações observadas foram associadas aos ITRNN, 1,53% aos ITRN e 0,77% aos IP, perfil semelhante ao observado recentemente no Brasil por Sprintz. Analisando a frequência de mutações associadas a cada classe de ARV observamos um aumento da presença de mutações associadas aos ITRNN que era ausente no estudo realizado em Pernambuco em 2002 (Medeiros,L.B.2006). A mutação K103N predominou entre as mutações aos ITRNN no nosso estudo bem como nos outros dois grandes estudos brasileiros (Sprinz 2009 e Inocêncio, 2009). Quanto aos ITRN, ao contrário de outros estudos, duas das nossas amostras apresentaram a mutação 184V e apenas uma amostra revelou a mutação 215F.É importante ressaltar que a mutação 184V ocorreu em dois indivíduos com infecção recente, o que pode explicar sua presença como uma tendência que tem esta mutação para se tornar indetectável ao longo do tempo entre os indivíduos

infectados com cepas resistentes aos antirretrovirais. O presente estudo mostrou uma alta prevalência de infecções recentes (23%), mas não houve diferença significativa na prevalência de mutações entre os indivíduos com infecção recente (RS) e os com infecção crônica LTS) da população infectada (teste exato de Fischer, $p = 0,327$). Duas amostras com infecções recentes e duas amostras com infecções crônicas apresentaram mutações relacionadas aos ITRNN embora as mutações relacionadas aos ITRN só ocorreram no grupo das infecções recentes (em duas amostras). A única amostra com mutação relacionada à IP ocorreu em paciente com infecção crônica. Esses achados provavelmente refletem a maior circulação das cepas com resistência aos ITRNN devido a esses ARV serem utilizados em regimes de primeira linha no Brasil, assim como revelam o maior *fitness* dessas mutações (Consenso para terapia ARV, Ministério da Saúde, 2008).

Como já foi observado em todas as regiões do Brasil, exceto na região Sul, houve um predomínio do subtipo B. Entretanto, no presente estudo, um elevado percentual do Subtipo F (37,7%) foi detectado circulando na região metropolitana do Recife. Esta taxa foi muito maior do que o normalmente observado em outras regiões do país. Além disso, parece haver uma tendência no aumento da circulação do subtipo F nesta região específica, que já era alta (26%) no estudo no Recife em 2002 (Medeiros L., et al 2006). Em pesquisas da região Nordeste, no estudo BResNet, das 34 amostras de Salvador 21% pertenciam ao subtipo F, enquanto em outro estudo da mesma cidade publicado em 2010, em 60 amostras observou-se apenas 4,9% de subtipo F e 3,3% de recombinantes B/F (Araújo et al. 2010), e ainda em trabalho realizado no Ceará observou-se apenas 15% de subtipos não B (Arruda E., et al, 2010). A baixa prevalência do subtipo F no Ceará se assemelha a estudo realizado para avaliação de resistência adquirida aos antirretrovirais naquele estado em 2004 que demonstrou apenas 5,6% de subtipo F (Cavalcanti AMS., et al. 2007).

É interessante observar que, embora o subtipo B prevalece no Brasil, há uma tendência na crescente prevalência do subtipo C no sul do país, um aumento de linhagens recombinantes BF (que inclui os CRF_28 e CRF_29 em cerca de 50% dos indivíduos infectados na cidade portuária de Santos, na região Sudeste do Brasil com altos níveis de resistência transmitida), e uma tendência de aumento da prevalência do subtipo F na região nordeste do país (Sucupira et al, 2007). No entanto, nossos resultados demonstram uma maior prevalência do subtipo F em

amostras analisadas apenas em uma pequena região genômica do HIV (região *pol*). É importante ressaltar que mutações de resistência relacionadas podem variar entre diferentes subtipos no Brasil e estudos de seguimento de cepas não-B, certamente merece mais atenção (Munerato et al, 2010). Reconhecemos que o pequeno tamanho da amostra analisada neste estudo e a pequena região do genoma do HIV caracterizada aqui, pode implicar em informações mais definitivas. No entanto, nós suspeitamos que um "microepidemia" do subtipo F está ocorrendo na região e que o perfil de resistência e prevalência podem estar alterando esta região, merecendo futuras avaliações dessas tendências.

Agradecimentos

Agradecemos às equipes do CTA participantes especialmente à João Carlos da Silva, Daniela Salustiano, Rejane Marquim, Kledoaldo Lima e Regineide Albuquerque. Agradecemos a Dra Cecília Sucupira e Dr. Ricardo Diaz da UNIFESP, pela revisão de seqüências genéticas e sugestões. Agradecemos a Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco especialmente a François Figueiroa e Adriana Cavalcanti

Fontes financiadoras:

Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco – Secretaria de Saúde _PE- Plano de ações e metas 2008/2009.

Programa de Cooperação Científica Novas Fronteiras entre o Programa de Pós graduação em Medicina Tropical- UFPE e o Programa de Pós Graduação em Infectologia da UNIFESP- Laboratório de Retrovirologia (PROCAD- CAPES- 2008)

REFERÊNCIAS

Araujo AF, Brites C, Monteiro-Cunha J, Santos LA, Galvao-Castro B, Alcantara LC. 2010. Lower prevalence of human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B found in northeastern Brazil with slower progression to AIDS. **AIDS Res Hum Retroviruses** 26: 1249-54.

Arruda E, Simões L, Sucupira C, Medeiros M, Arruda E, Diaz R, Lima A. Intermediate Prevalence of HIV Type 1 Primary Antiretroviral Resistance in Ceará State, Northeast Brazil 2010. *AIDS Res Human Retroviruses* 26: 1-3

Bracciale L, Colafigli M, Zazzi M, Corsi P, Meraviglia P, Micheli V, Maserati R, Gianotti N, Penco G, Setti M, Di Giambenedetto S, Butini L, Vivarelli A, Trezzi M, De Luca A 2009. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1-infected patients in Italy: evolution over 12 years and predictors. **J Antimicrob Chemother** 64: 607-15.

Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme AM, Sandstrom P, Boucher CAB, Vijver D, Rhee SY, Liu TF, Pillay D, Shafer RW 2009. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PlosOne** 4: 4724

Bezemer D, de Ronde A, Prins M, Porter K, Gifford R, Pillay D, Masquelier B, Fleury H, Dabis F, Back N, Jurriaans S, van der Hoek L; CASCADE collaboration 2006. Evolution of transmitted HIV-1 with drug-resistance mutations in the absence of therapy: effects on CD4+ T-cell count and HIV-1 RNA load. **Antivir Ther** 11:173-8.

Brazilian Ministry of Health. National Program of STD and AIDS. Diretrizes para organização e funcionamento dos CTA do Brasil. Brasília, 2010, cited 2010 Oct 15. Available from: <http://www.aids.gov.br/publicacao/diretrizes-para-organizacao-e-funcionamento-dos-cta>.

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

Ceccherini-Silberstein F, Cento V, Calvez V, Perno C-F 2010. The use of human immunodeficiency virus resistance tests in clinical practice. *Clin Microbiol Infect* 16: 1511-1517.

Chaix ML, Descamps D, Wirden M, Bocket L, Delaugerre C, Tamalet C, Schneider V, Izopet J, Masquelier B, Rouzioux C, Meyer L, Costagliola D; ANRS AC11 Resistance Group; Cohort PRIMO ANRS CO 6; FHDH ANRS CO4 Study Groups 2009. Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. *AIDS* 23: 717-24.

Grangeiro A. Diagnóstico situacional dos Centros de Testagem e Aconselhamento. São Paulo, Instituto de Saúde, 2007. (Relatório de Pesquisa). Disponible at http://www.aids.gov.br/sites/default/files/relatorio_situacional_cta.pdf, 2010.

Inocência LA, Pereira AA, Sucupira MCA, Fernandez JCC, Jorge, CP, Souza DFC, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simão M, Tanuri A 2009. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 12: 20.

Johnson VA, Brun-Vézinet F, Cltett B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Shapiro JM, Richman DD 2008. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: december 2008. *Topics in HIV Med* 16: 138-145.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73: 152-60.

Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AMS, Albuquerque MFPM 2006. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101: 845-849.

Myatt M, Bennet DE 2009. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. **Antivir Ther** 13 suppl 2: 37-48.

Paredes R, Lalama CM, Ribaud HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguere F, Meyer WA 3rd, Johnson VA, Fiscus SA, D'Aquila RT, Gulick RM, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team 2010. Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. **J Infect Dis** 201: 662-71.

Sprinz E, Netto EM, Lima MP, Furtado JJ, Eira M, Zajdenverg R, Madruga JV, Lewi DS, Machado AA, Pedro RJ, Soares MA 2009. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1- infected individuals in Brazil. **AIDS Res Human Retroviruses** 25: 861-867.

Stanford University. *Stanford Sequence Resistance Database*. Stanford, 2005. Disponível em: <<http://hivdb.stanford.edu>>. Acesso em: 20 outubro. 2010.

Teixeira PR, Vitória MA, Barcarolo J 2004. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. **AIDS** 18 Suppl 3: 5-7.

Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, Mahle KC, Heneine W, Johnson JA, Hall HI; Variant, Atypical, and Resistant HIV Surveillance Group 2010. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, U.S.-2006. **AIDS** 24: 1203-12.

6. 2. ARTIGO 2

INFECÇÃO RECENTE E PREVALENCIA DO HIV EM CENTROS DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE- PERNAMBUCO

INFECÇÃO RECENTE E PREVALENCIA DO HIV EM CENTROS DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-PERNAMBUCO

Ana Maria Salustiano Cavalcanti¹

Ana Maria de Brito³

Daniela Medeiros Salustiano⁴

Kledoaldo Oliveira de Lima²

Sirleide Pereira da Silva¹

Heloisa Ramos Lacerda²

¹ Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), Setor de Virologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Centro de Pesquisas Ageu Magalhães – CPqAM- FIOCRUZ – Recife-Pernambuco – Brasil

⁴ Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) Herbert de Souza, Cabo de Santo Agostinho Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Endereço para Correspondência:

Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Rua Deolinda Francisca de Souza, 217-Janga

Paulista – PE-ZIP cod- 53439-290 –

e-mail: a_salustiano@yahoo.com.br

RESUMO

Para compreender as tendências da transmissão do HIV e detectar a presença de infecção recente, utiliza-se o teste *BED Capture enzyme immunoassay* (BED-CEIA) com capacidade de determinar se uma pessoa foi infectada recentemente distinguindo-a de pessoas com infecção crônica. No Brasil vários Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) facilitam o acesso ao diagnóstico precoce para o HIV. No presente estudo determinou-se a prevalência da infecção pelo HIV e a frequência de infecção recente em indivíduos com HIV/Aids, em cinco Centros de Testagem e Aconselhamento em DST/AIDS da região metropolitana do Recife-Pernambuco, região Nordeste do Brasil, entre 2007 e 2009. Foram testadas 46.696 indivíduos, com prevalência global de 1,96% de infecções pelo HIV em indivíduos testados com maior prevalência no Recife (3,9%) e Jaboatão dos Guararapes (2,2%). A prevalência foi maior no sexo masculino (3,93%), entre homens que fazem sexo com homens (14%), na faixa etária acima dos 40 anos (2,72%). A frequência global das infecções recentes em 169 indivíduos foi de 23,7%. A comparação dos indivíduos com infecções recentes versus crônicas mostrou que as infecções recentes foram mais frequentes em indivíduos com menos de 25 anos e nos municípios do Recife (35,7%), Cabo de Santo Agostinho (31,2%) e Jaboatão dos Guararapes (23%), localizados ao sul da região Metropolitana. Houve discreto predomínio de homens (1,5 vezes maior que entre mulheres), maior frequência de heterossexuais nos dois grupos, mas ainda parcela significativa de homens que fazem sexo com homens (HSH) (33%). Predominou o subtipo B, seguido de elevada proporção de subtipos F (cerca de 40%) tanto nas infecções recentes quanto crônicas. Concluímos que a infecção recente ocorre principalmente nas faixas etárias mais jovens e com maior frequência entre heterossexuais, apesar de frequência significativa entre HSH. A infecção predomina no sexo masculino e Recife é a cidade com maior prevalência de infecção e maior percentual de infecções recentes.

alavras chave: HIV, infecção recente, BED, prevalência,CTA

ABSTRACT

To understand the trends in HIV transmission and the presence of recent infection, we use the test Capture BED enzyme immunoassay (BED-CEIA) with the ability to determine whether a person was infected recently distinguishing it from people with chronic infection. In Brazil, several centers and Counseling Center (CTA) facilitate access to early diagnosis for HIV. In the present study determined the prevalence of HIV infection and frequency of recent infection in individuals with HIV / AIDS in five Centers for Testing and Counseling on STD / AIDS in the metropolitan area of Recife, Pernambuco, Northeastern Brazil, between 2007 and 2009. 46,696 individuals were tested with an overall prevalence of 1.96% of HIV infections in individuals tested with the highest prevalence in Recife (3.9%) and Jaboatão Guararapes (2.2%). The prevalence was higher in males (3.93%) among men who have sex with men (12,4%), aged above 40 years (2.72%). The overall frequency of recent infections in 169 subjects was 23.7%. The comparison of individuals with recent infections versus chronic showed that recent infections were more common in people under 25 years and in the cities of Recife (35.7%), Cabo de Santo Agostinho (31.2%) and Jaboatão Guararapes (23%), located south of the metropolitan area. There was a slight predominance of men (1.5 times higher than among women), higher incidence of heterosexuals in both groups, but still significant portion of men who have sex with men (MSM) (33%). The predominant subtype B, followed by a high proportion of subtype F (40%) in both chronic and recent infections. We conclude that early infection occurs mainly in younger age groups and more frequent among heterosexuals, despite significant frequency among MSM. The infection predominates in males and Recife is the city with the highest prevalence of infection and a higher percentage of recent infections.

Keywords: HIV, recent infection, BED, prevalence, CTA

INTRODUÇÃO

Diferentes metodologias têm sido utilizadas na vigilância epidemiológica da infecção pelo HIV e aids no mundo inteiro, para avaliar e melhorar o monitoramento das tendências da epidemia. A maioria dos dados epidemiológicos disponíveis é baseada em estudos transversais de prevalência e variam consideravelmente em virtude das condições locais, da população do estudo e da metodologia empregada. A epidemia pelo HIV no Brasil tem diferentes características epidemiológicas e virológicas de acordo com as regiões e com as populações estudadas, apresentando cerca de 630.000 indivíduos infectados estimados pelo Departamento Nacional de DST/Aids e Hepatites virais. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A epidemia brasileira é considerada concentrada pela OMS, ou seja, apresenta baixa prevalência na população em geral e prevalências bem mais elevadas nos grupos de risco, principalmente homens que fazem sexo com homens (HSH), profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis (UDI) (UNAIDS 2010). No Brasil, a taxa de prevalência da infecção pelo HIV é menor que 1% na população em geral e vem se mantendo estável desde 2004. Porém em grupos com risco acrescido para infecção, taxas de prevalência do HIV em torno de 5,9% foram detectadas em UDI, de 10,5% entre HSH e de 5,1% foi observada em mulheres profissionais do sexo em estudo realizado em 10 capitais brasileiras entre 2008 e 2009 (BARBOSA JR. A., *et al*, 2009). No Brasil, a epidemia de aids tem característica peculiares por região e a taxa de incidência de aids apresenta uma tendência a estabilização, observando-se uma diminuição nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e aumento nas regiões Norte, Nordeste e Sul (BRITO AM., *et al*, 2005 ; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010) .Por outro lado, as medidas da incidência da infecção pelo HIV podem oferecer informações mais detalhadas para monitorar a epidemia, tornando-se uma ferramenta importante para a identificação de grupos de maior vulnerabilidade para a infecção, podendo direcionar os programas de prevenção e controle. (McDOUGAL *et al*, 2005).

Ensaio para detectar infecção recente pelo HIV estão sendo utilizados em estudos científicos para calcular a taxa de novas infecções pelo HIV. Em 1998, o Centro de Controle de Doenças –CDC, padronizou uma metodologia, baseada em um algoritmo de ensaios sorológicos para a identificação de infecções recentes pelo HIV-

1 conhecido como **STARHS** - *Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion* (JANSEN et al,1998). Em 2001, Parekh e colaboradores desenvolveram uma nova metodologia, chamada de Ensaio Imunoenzimático-BED de Captura de IgG (*IgG-Capture BED-EIA®-Biomedical Corporation USA*)), baseado na detecção de proporções crescentes de IgG específica após soroconversão. Este método utiliza como antígenos, peptídeos derivados da região imunodominante da gp41, contendo seqüências dos subtipos B, E e D, representativas de múltiplos subtipos do HIV-1 (PAREKH e McDOUGAL, 2001; PAREKH et al., 2002).

O ensaio pode determinar qual a percentagem de uma população de indivíduos infectados pelo HIV foram infectados no prazo de seis meses anteriores à data da coleta da amostra, desde que avaliados com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes estudados, e não deve ser usado em rotina para diagnóstico da infecção pelo HIV. O ensaio quantitativo determina a IgG específica para o HIV em relação a IgG total no soro e calcula o aumento da IgG específica que ocorre no início da infecção pelo HIV. Este aumento é gradual e no período de até 160 dias (em geral) ainda não atingiu valores que são detectáveis nos testes tradicionais, sendo considerado, então, o período de “janela” da soroconversão. O teste apresenta índices de sensibilidade de 81,7% e especificidade de 89,1% para a identificação de amostras incidentes tendo como padrão ouro a soroconversão documentada, e seu desempenho não é afetado pela diversidade do HIV-1. (PAREKH e McDOUGAL, 2001). Parekh e McDougal (2005) atestaram que o teste BED – CEIA utilizado em diferentes populações, como usuários de drogas endovenosas (UDI), gestantes e até em soros congelados (sorotecas), podem apresentar consistência para estudos de vigilância epidemiológica, permitindo verificar a tendência na variação dos níveis de incidência quando amostras de diferentes anos estão disponíveis para testagem.

No Brasil, vários estudos sobre infecção recente têm sido descritos. Bassichetto e colaboradores analisaram a proporção de infecções recentes em alguns CTA da cidade de São Paulo, e encontraram 15% de infecção recente em 194 indivíduos testados pelo ensaio Vironostika-Biomerieux, e as infecções recentes foram mais freqüentes em indivíduos mais jovens, menores de 25 anos de idade. (BASSICHETTO KC., et al, 2009) Em Curitiba, em 32 amostras positivas para HIV analisadas por Ferreira et al. (2008) utilizando o ensaio BED-CEIA, foi identificada 25% de infecção recente, salientando que o subtipo C foi mais freqüente nessas infecções recentes (63%). No Ceará, em amostras coletadas em 2008/2009

foi encontrado um percentual de 6,8% de infecção recente em 74 pacientes virgens de tratamento antirretroviral atendidos em dois hospitais de referencia para DST/Aids do estado (ARRUDA E., *et al.*, 2010). Estudo do Rio de Janeiro, em 434 amostras congeladas que foram coletadas de novembro/2004 a outubro/2005, recrutadas de três CTA da região metropolitana, foi detectado 14% de infecção recente utilizando-se o BED-CEIA. (de CASTRO *et al*, 2010)

Os Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) foram implantados para melhorar o acesso a testagem estimulando o diagnóstico e o tratamento precoce da infecção pelo HIV, e estão espalhados em todo o território nacional. Em Pernambuco existem 24 CTA distribuídos em todo o estado, sendo cinco localizados em pontos estratégicos da Região Metropolitana do Recife (RMR), onde possuem maior demanda de testagem para o HIV devido à fácil localização e fácil acesso. Os CTA recebem na sua maioria indivíduos assintomáticos que se expuseram a algum risco de contrair a infecção, constituindo-se assim em locais privilegiados para detecção de novos casos de infecção pelo HIV e a nova técnica que representa um avanço para a revelação de infecções recentes. (MINISTERIO DA SAÚDE, 2008)

O objetivo deste estudo é descrever a prevalência da infecção pelo HIV em cinco CTA da Região Metropolitana do Recife, no período de julho de 2007 a abril de 2009, determinar a frequência de infecção recente em indivíduos soropositivos para o HIV-1 recém-diagnosticados nesses CTA, e comparar as características sócio demográficas e laboratoriais dos indivíduos com infecção recente e infecção estabelecida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo transversal com usuários de cinco Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) situado na região metropolitana do Recife, Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista e do município do Recife, recrutados no período de julho de 2007 a abril de 2009. Os indivíduos recém diagnosticados com infecção pelo HIV segundo os critérios do Ministério da Saúde do Brasil (www.aids.gov.br), ao retornarem para receber seus resultados, foram apresentados ao estudo no aconselhamento pós-teste, e os que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e realizaram a coleta de sangue destinado aos testes laboratoriais específicos. As amostras foram enviadas ao LACEN-PE-Virologia, acompanhadas do formulário específico do projeto,

centrifugadas e os plasmas foram armazenados a -70°C para serem processadas gradativamente.

Foram analisadas 169 amostras de indivíduos que preenchiam os critérios de inclusão do estudo: recém diagnosticados para a infecção pelo HIV-1 e virgens de tratamento antirretroviral, utilizando-se para detecção de infecção recente o ensaio *BED-Calypste*® - BED-CEIA. Os controles (negativo, positivo forte e positivo fraco) e os calibradores foram testados junto com as amostras de acordo com as instruções do fabricante (Calypste Biomedical Corporation – Oregon, USA). Os resultados das amostras foram avaliados conforme os resultados das Densidades óticas (DO) sendo considerados positivos valores ≤ 1.2 e após repetição em triplicata, foram consideradas com infecção recente as amostras com $DO \leq 0.80$.

Os resultados dos testes anti-HIV utilizados no estudo de prevalência da infecção pelo HIV e os dados sócio-demográficos dos indivíduos testados foram obtidos a partir do banco de dados de cada CTA e do histórico dos usuários emitido pelo banco de dados SIREX (Sistema de Resultado de Exames Laboratoriais da Coordenação Estadual de DST/AIDS de Pernambuco). Os resultados de Carga viral e contagem de linfócitos TCD4 foram resgatados do banco de dados SISCEL (Sistema de controle de exames laboratoriais do Departamento Nacional de DST/Aids e Hepatites Virais). Os dados dos indivíduos testados para a infecção recente foram transcritos para questionário individual específico do projeto, digitados nos programas EPIINFO versão 6.0 em dupla entrada e em planilhas Microsoft Office Excel versão 2007. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, registro CEP/CCS/UFPE nº 120/07-SISNEP FR-134429.

RESULTADOS

Segundo dados obtidos no SIREX no período de julho de 2007 a abril de 2009, foram testados 46.696 indivíduos, identificando-se com positividade para HIV em 996 indivíduos, resultando em prevalência geral de 1,96%. A prevalência da infecção pelo HIV variou de 1,2 a 3,9% nos cinco CTA, sendo mais elevada nos CTA de Recife (3,9%) e Jaboatão dos Guararapes (2,2%). Entre os indivíduos testados para infecção recente, a frequência global de positividade foi 23,7%, sendo mais

elevados nos CTA dos municípios de Recife (34,7%), Cabo (31,2%) e Jaboatão (23,0%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Prevalência do HIV-1 em cinco CTA localizados na região metropolitana do Recife e amostras testadas para detecção de infecção recente
Período: julho/2007 a abril/2009

CTA	Número de amostras			Prevalência (%) IC (95%)	Número de amostras	
	Testadas para HIV	Positivas	Negativas		Testadas pelo BED	Infecções recentes
OLINDA	9297	119	9178	1,27 1,06 – 1,53	20	2 (10%)
CABO	11440	148	11292	1,29 1,09 – 1,52	64	20 (31,2%)
JABOATÃO	11519	256	11263	2,2 1,96 – 2,51	39	9 (23%)
PAULISTA	6544	81	6463	1,23 0,98 – 1,54	32	4 (12,5%)
RECIFE	7896	312	7584	3,9 3,53 – 4,40	14	5 (35,7%)
TOTAL	46696	916	45780	1,96 1,84 – 2,09	169	40 (23,7%)

As informações sobre sexo, faixa etária e categoria de exposição dos indivíduos testados nos CTA dos municípios do Cabo de Santo Agostinho, Olinda e Jaboatão dos Guararapes estão descritos na Tabela 2. Verifica-se que a grande maioria das pessoas testadas é do sexo feminino e com idade abaixo dos 25 anos. Quanto aos positivos, a taxa de prevalência foi maior no sexo masculino (4%) do que no sexo feminino (1,02%) e há elevada prevalência da infecção entre HSH (14%) comparada aos HTS (1,49%), e maior prevalência na faixa etária acima dos 40 anos de idade (2,8%) comparadas aos indivíduos com menor idade.

Tabela 2 – Prevalência do HIV-1 em três CTA^a localizados na Região Metropolitana do Recife, de acordo com o sexo, faixa etária e categoria de exposição
Período: julho/2007 a abril/2009

Variáveis	Número de amostras Testadas	Amostras HIV positivas			p-valor
		Número	%	IC ^b (95%)	
Total	32.256	523	1,62	1,48 – 1,76	-
Sexo					
Masculino	6.718	264	3,93	3,48 – 4,42	<0,001
Feminino	29.538	259	0,88	0,77 – 0,99	
Categoria de exposição					
HTS ^c	30.156	445	1,48	1,34 – 1,62	<0,001
HSH ^d	427	53	12,4	9,43 – 15,9	
Faixa etária					
Menos de 25 anos	16.161	132	0,82	0,68 – 0,97	<0,001
De 25 a 40 anos	11.877	276	2,32	2,06 – 2,61	
Maior de 40 anos	4.218	115	2,72	2,26 – 3,26	

a: CTAs: Cabo de Sto.Agostinho, Olinda e Jaboatão dos Guararapes.

b: IC – Intervalo de confiança c: HTS = heterossexual; d: HSH= homem que faz sexo com homem

Dos 169 indivíduos testados pelo teste BED-CEIA, para definir a condição da infecção, se recente ou crônica, 40 (23,7%) foram classificados como portadores de infecção recente, ou soroconvertores recentes (RS). As variáveis sexo e categoria de exposição não apresentam diferenças estatisticamente significantes em relação a condição da infecção pelo HIV. No entanto, os indivíduos com infecção recente são mais jovens do que os com infecção crônica, ($p<0,05$). Observa-se maior positividade das infecções no grupo heterossexual, porém identifica-se um percentual de 33% de infecção recente no grupo de HSH. A mediana do número de linfócitos CD4 nos indivíduos com infecção recente foi de 560 células/mm³, contra 409 linfócitos/mm³ nos indivíduos com infecção crônica e a carga viral teve mediana de 795 cópias de RNA/mL nos pacientes com infecção recente contra 8.540 cópias de RNA/mL nos pacientes com infecção crônica, não se observando diferenças significantes entre os dois grupos. A caracterização molecular das amostras para verificação dos subtipos

virais, não mostra diferença entre os dois grupos, observando-se uma maior circulação do subtipo B seguido do subtipo F (Tabela 3).

Tabela 3. Características da população segundo condição da infecção pelo HIV

Características	Infecção recente		Infecção crônica		Total		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Total	40	23,7	129	76,3	169	100,0	
Faixa etária							
Menor de 25 anos	12	30,0	15	11,6	27	16,0	0,011
De 25 a 40 anos	23	57,5	80	62,0	103	60,9	
Maior de 40 anos	5	12,5	34	26,4	39	23,1	
SEXO							
Feminino	16	40,0	60	46,5	76	45,0	0,470
Masculino	24	60,0	69	53,5	93	55,0	
Categoria de exposição							
Masculino							
HSH	9	37,5	18	26,1	27	29,0	0,569
HTS	15	62,5	51	73,9	66	71,0	
Feminino							
Heterossexual	16	100,0	60	100,0	76	100,0	-
CTA de origem							
Cabo	20	50,0	44	34,1	64	37,9	0,114
Jaboatão	9	22,5	30	23,2	39	23,1	
Olinda	2	5,0	18	14,0	20	11,8	
Paulista	4	10,0	28	21,7	32	18,9	
Recife	5	12,5	9	7,0	14	8,3	
CD4 (em cels/ml)							
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	560 (119; 884)		409 (215; 672)		418 (208; 696)		0,376
Carga viral (em cópias/ml)							
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	795 (179; 39.174)		8.540 (208; 39.121)		7.491 (198; 39147)		0,421
Subtipo do HIV							
B	15	60,0	44	53,0	59	54,6	0,796
F	8	32,0	35	42,2	43	39,8	
C	1	4,0	2	2,4	3	2,8	
BF	1	4,0	2	2,4	3	2,8	

** Associação Infecção recente e categoria de exposição independente do sexo

A localização geográfica dos cinco CTAs estudados pode ser visualizada na Figura 7. A distribuição dos dados de prevalência da infecção pelo HIV e frequência de infecções recentes mostra que ambas são maiores no Recife, seguida dos municípios de Jaboatão dos Guararapes e Cabo de Santo Agostinho

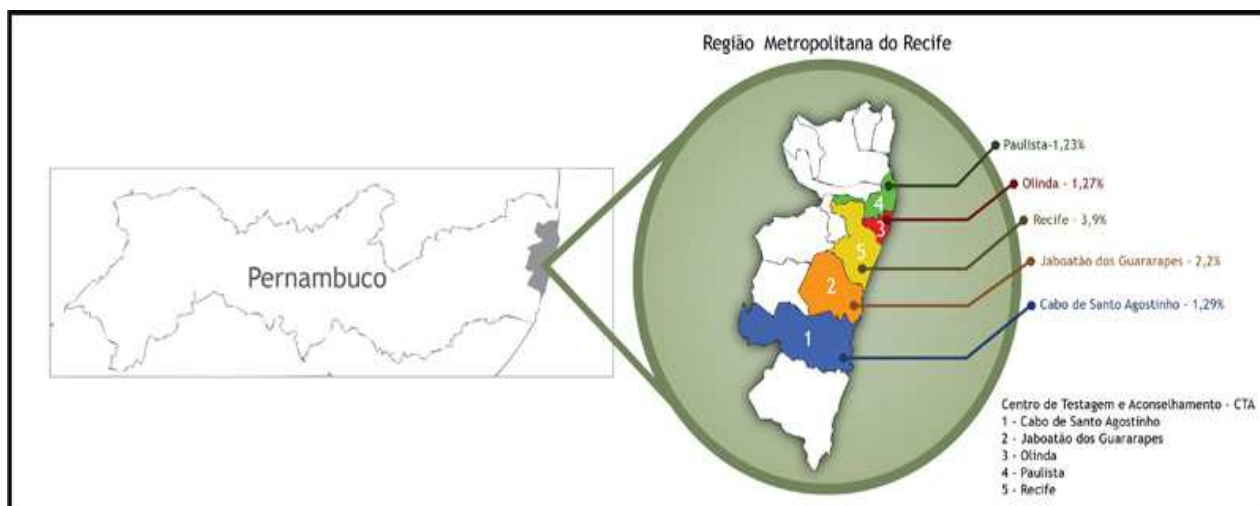


Figura 7. Mapa da Região Metropolitana do Recife, localização dos CTA da pesquisa e prevalência do HIV-1

DISCUSSÃO

O presente estudo revelou prevalência global de 1,96% de infecções pelo HIV em indivíduos testados em cinco CTA da Região Metropolitana do Recife (entre 2007 e 2009), com maior prevalência no Recife (3,9%) e Jaboatão dos Guararapes (2,2%). A prevalência foi maior nos homens, na categoria de exposição de homens que fazem sexo com homens (14%), na faixa etária acima dos 40 anos. A frequência global das infecções recentes em 169 indivíduos foi de 23,7%. A comparação dos indivíduos com infecções recentes versus crônicas, mostrou que as infecções recentes foram mais frequentes em indivíduos com menos de 25 anos e nos municípios do Recife (35,7%), Cabo de Santo Agostinho (31,2%), Jaboatão dos Guararapes (23%), localizados ao sul da região Metropolitana. Houve discreto predomínio de homens, maior frequência de heterossexuais nos dois grupos, mas ainda parcela significativa de homens que fazem sexo com homens (33%). Houve similaridade dos subtipos virais, predominando o subtipo B, entretanto com elevada proporção de subtipos F (cerca de 40%) tanto nas infecções recentes quanto crônicas.

O presente estudo apresenta dados de CTA localizados em cinco municípios populosos da grande região metropolitana do Recife que totalizam 3.042.426 habitantes. Recife é capital do estado de Pernambuco, localizado na região nordeste do Brasil, uma das regiões mais pobres e populosas do Brasil (IBGE, 2010). A frequência de 23,7% de infecções recentes mostra uma epidemia ainda em ascensão na Região Metropolitana e apontam que Recife é o município onde a prevalência das infecções diagnosticadas, bem como a frequência de infecções recentes é a maior dentre os cinco municípios avaliados. Tal aspecto está de acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, 2010, que aponta Recife, como a quarta cidade brasileira em incidência de casos de aids com 58,4casos/100.000habitantes, quando em 1999 a incidência era de 20,4casos/100.000habitantes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL 2010). Por outro lado, cidades localizadas ao sul da Região Metropolitana também evoluem com elevada frequência de infecções recentes, como é o caso do Cabo de Santo Agostinho (31,2%) e Jaboatão dos Guararapes (23%), diferentemente de cidades localizadas no litoral norte, como Olinda e Paulista que apresentam 10 e 12,5% de infecções recentes, respectivamente. Cabe ressaltar que o estado de Pernambuco vivencia importante crescimento econômico com elevação do PIB para 7,8% no primeiro semestre de 2010. Este crescimento ocorreu principalmente em decorrência de maior atividade do Porto de Suape e de polo industrial e de indústria naval localizados no município do Cabo de Santo Agostinho, com migração de trabalhadores jovens, do sexo masculino, de todo o estado e, inclusive, da região sudeste do Brasil (Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco 2011), aspecto que embora positivo do ponto de vista econômico pode ter-se refletido no aumento das infecções pelo HIV.

Quanto ao sexo, observou-se elevado número de mulheres testadas, mas com predomínio de infecções em homens. O grande número de mulheres testadas deve-se, primordialmente, às características dos CTAs no Brasil, local indicado para a testagem do HIV em gestantes. A participação das gestantes pode ter reduzido a prevalência da infecção entre as mulheres, que foi quatro vezes menor nas mulheres do que nos homens, pois, provavelmente inclui um grande número de mulheres sem situação de risco, enquanto os homens que procuraram os CTAs, possivelmente procuraram o CTA por encontrar-se em maior risco de exposição. Entretanto, quando avaliados quanto à presença de infecção recente, a frequência de homens

foi apenas 1,5 vezes maior do que a das mulheres, aspecto que está de acordo com a frequência dos casos de aids notificados ao Ministério da Saúde em 2010 e nos anos recentes, que mostra uma relação de 1,5 homem para cada mulher com aids no Brasil na última década (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010).

Em relação à categoria de exposição, a via sexual foi a predominante, com uma parcela significativa de heterossexuais, tanto nas infecções recentes quanto nas crônicas. Entretanto a característica de epidemia concentrada, ou seja, com grupos de maior risco, ainda parece ocorrer, pois tanto na avaliação da prevalência quanto na das infecções recentes, os homens que fazem sexo com homens constituem parcela significativa dos infectados. Este grupo apresenta prevalência nove vezes maior da infecção comparado aos heterossexuais e constitui 1/3 dos homens com infecção recente.

Enquanto o estudo de prevalência mostra maior prevalência de infecções em faixas etárias acima de 40 anos, as infecções recentes apontam a tendência de casos novos em faixas etárias mais jovens, abaixo dos 25 anos. Realmente, enquanto os países desenvolvidos caminham para infecções em idades mais avançadas, no Brasil, faixas etárias mais jovens, das regiões mais pobres são aquelas onde o número de casos de aids avança significativamente e acomete indivíduos que iniciam sua vida sexual precocemente, sem sexo seguro e perdem grandes quantidade de anos produtivos (BASTOS FI, et al.,2008).

Quanto aos testes laboratoriais, observa-se que os pacientes apresentam-se geralmente em estágio de imunossupressão pouco avançada, com medianas de linfócitos CD4 acima de 400 células/mm³ e carga viral abaixo de 10.000 cópias, tanto nas infecções recentes quanto nas crônicas. Estes achados reforçam a importância da procura dos centros de testagem em estágios mais precoces, que resultam na redução da transmissão e melhores resultados da terapia. Tal dado contrasta, entretanto, com o momento de chegada dos indivíduos à assistência médica na Região Nordeste, geralmente já em estágio tardio e com imunossupressão avançada. Falhas na orientação pós-teste quanto ao benefícios do acompanhamento médico precoce, ou dificuldades no acesso à assistência são fatores importantes nesta disparidade dos momentos do diagnóstico do CTA e da chegada à assistência já descritas anteriormente no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE,2008)

Não há grande variação dos subtipos virais encontrados nas infecções recentes ou crônicas, com predomínio do subtipo B seguido do subtipo F. Diferentemente da região sul, a frequência do subtipo C permanece baixa nos dois grupos, menor do que 5%. Observa-se, entretanto que a frequência do subtipo F encontra-se bastante elevada, cerca de 32% nas infecções recentes e 42,2% nas crônicas, sendo bastante elevada comparativamente a outras regiões do Brasil e até mesmo quando comparados a outros estados da região nordeste, mostrando circulação diferenciada deste subtipo no Recife.

As principais limitações do estudo referem-se da falta de análise em separado das gestantes no cálculo da prevalência da infecção pelo HIV, fato que decorreu da dificuldade da obtenção deste dado no banco de dados SIREX dos CTA. Outra limitação é o pequeno número de amostras testadas para a determinação da infecção recente e crônica, impedindo o cálculo da incidência de infecção recente pelo HIV. Entretanto, trata-se de uma análise de uma região bastante populosa, com grande número de indivíduos testados, numa área com epidemia crescente e escasso número de publicações sobre o tema. Consideramos que este estudo pode enriquecer a discussão sobre as melhores estratégias para a prevenção da infecção pelo HIV nos locais de maior risco e entre os indivíduos mais jovens e de maior vulnerabilidade.

Agradecimentos

Agradecemos às equipes do CTA participantes especialmente à João Carlos da Silva, Daniela Salustiano, Rejane Marquim, Kledoaldo Oliveira e Regineide Albuquerque. Agradecemos a Dra Cecília Sucupira e Dr. Ricardo Diaz da UNIFESP, pela revisão de seqüências genéticas e sugestões. Agradecemos a Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco especialmente a François Figueiroa e Adriana Cavalcanti.

Fontes financiadoras:

Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco – Secretaria de Saúde _PE- Plano de ações e metas 2008/2009.

Programa de Cooperação Científica Novas Fronteiras entre o Programa de Pós graduação em Medicina Tropical- UFPE e o Programa de Pós Graduação em Infectologia da UNIFESP- Laboratório de Retrovirologia (PROCAD- CAPES- 2008)

REFERÊNCIAS

ARRUDA, E.; SIMOES,L.; SUCUPIRA,M.C.;MEDEIROS,M.,ARRUDA E., DIAZ,R., LIMA, A. Intermediate prevalence of HIV type 1 Primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**. 2010. V 26(12)

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2000, V. 34(2), p. 207-217.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. Regional patterns of the temporal evolution of the AIDS epidemic in Brazil following the introduction of antiretroviral therapy. **Braz J Infect Dis**. 2005; 9(1):9-19.

BARBOSA JR.A. Desafios para o monitoramento da epidemia de HIV/aids entre os grupos populacionais sob maior risco no Brasil. Tese Doutorado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2008, disponível em <http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/BarbosaJuniorad.pdf>, acesso em 18 de janeiro de 2011.

BASTOS FI., CACERES C., GALVAO J., VERAS MA., CASTILHO EA.,: AIDS in Latin America: assessing the current status of the epidemic and the ongoing response. 2008, **Int. J.Epidemiol** ,27:729-737.

BASSICHETO, K.C.; BERGAMASCHI, D.P.; VERAS, M.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; MESQUITA, F.; DIAZ, R.S. Estimating HIV-1 incidence using the serological testing algorithm for recent HIV infection at HIV counseling and testing centers in the city of São Paulo, Brazil. **The Brazilian Journal of Infections Disease**. 2009.V.13(1), 9-12

CALYPTE BIOMEDICAL CORPORATION. Bula do fabricante do kit: Aware™ BED™ EIA HIV-1 Incidence test. Enzyme immunoassay for population estimates of HIV-1 incidence. 2008.

CDC – USA, 2007. Using the BED HIV-1 capture EIA assay to estimate incidence using STARHS in the context of surveillance in the United States. Updated october, 2007. Disponível

<<http://www.cdc.gov/hiv/topics/surveillance/resources/factsheets/pdf/bed.pdf>>.

Acesso em: 10 de dezembro de 2010

De CASTRO C.A.V., GRINSZTEJN, B., VELOSO, V.G., BASTOS, F..I., PILOTTO, J.H., MORGADO, M.G. Prevalence, estimated HIV-1 incidence and viral diversity among people seeking voluntary counseling and testing services in Rio de Janeiro, Brazil. 2010, **BMC Infectious Diseases**, 10:224

FERREIRA, J. L. P.; THOMAZ, M.; RODRIGUES, R.; HARRAD, D.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA C. A. F.; BATISTA, J. P. G.; ITO, T. S., BRÍGIDO, L. F. M. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 103(8), p.800-808, 2008.

JANSSEN RS, SATTEN GA., STRAMER SL, RAWAL BD., O'BRIEN TR., WEILBLER BJ., et al New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates. **JAMA**, 1998; 280 (1):42-48

McDOUGAL JS, PILCHER CD, PAREKH BS, GERSHY-DAMET G, BRANSON BM, MARSH K, WIKTOR SZ. Surveillance for HIV-1 incidence using tests for recent infection in resource-constrained countries. **AIDS** 2005; 19 (suppl 2):S25-S30

Ministério da Saúde do Brasil. Boletim epidemiológico de Aids e DST, ano VII, no. 1, Brasília, 2010, 21p., acesso em 10 de novembro de 2010. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010_preliminar

MINISTERIO DA SAÚDE –Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais.
Contribution of the Test and Counseling Centers to Universalize the Diagnosis and
Guarantee the Equality in the Access to the Services.

Calypte Biomedical Corporation. **Calypte HIV-1 BED Incidence EIA**. Disponível em
http://www.calypte.com/PRODUCTS/INSERTS/BED_MSDS-LN-20500-02.pdf].

PAREKH, B. S.; KENNEDY, M. S.; DOBBS, T.; PAU, C.; BYERS, R.; GREEN, T.;
HU, D. J.; VANICHSENI, S.; YOUNG, N. L.; COOPANYA, K.; MASTRO, T. D.;
McDOUGAL, J. S. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after
seroconversion: A simple assay for detection recent HIV infection and estimating
incidence. **AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES**. V. 18(04), p.295-307,
2002.

PAREKH, B. S.; McDOUGAL, S. Application of laboratory methods for estimation of
HIV-1 incidence. **Indian J Med Res**. 121,p. 510-518, 2005.

PROGRAMA ESTADUAL DST/AIDS – PERNAMBUCO. Boletim informativo –
DST/AIDS. Ano IX, n.02. Dezembro, 2009.

UNAIDS. **UNAIDS** report on the global aids epidemic 2010. Disponível em
www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm, acessado em 17 de janeiro de 2011.

Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco. Desempenho do
produto interno bruto de Pernambuco no 4º. trimestre e no ano de 2010. [cited 2011
Mar 09] Available from: <http://www2.condepefidem.pe.gov.br/web/condepeFidem>.

7. CONCLUSÕES

- A prevalência de resistência primária revelada neste estudo foi de 6,1% segundo os critérios da *International AIDS Society* (IAS) -2009 e de 4,6% baseada na lista de mutações *Surveillance Drug Resistance Mutations* SDRM-2009-OMS, demonstrando um percentual baixo de resistência primária comparado aos detectados em outras regiões do Brasil (Sul e Sudeste). Foi também considerado baixo (<5%) segundo a metodologia HIV Threshold Survey da Organização Mundial de Saúde (HIV-THS,WHO) ;
- A prevalência da resistência detectada no presente estudo foi mais elevada que a detectada em 2002 (3,6%) demonstrando um aumento gradual da resistência primária no estado, apesar das diferenças entre as populações estudadas;
- A prevalência da resistência foi semelhante à detectada em Salvador (4,6%), porém mais baixa do que a encontrada no Ceará (9,5%). Vale salientar que no presente estudo a amostragem foi exclusiva de usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife;
- As mutações associadas aos ITRNN foram mais prevalentes concordando com outros estudos realizados no Brasil. Essas mutações não tinham sido detectadas no estudo anterior realizado em 2002 em Pernambuco;
- A mutação 184V associada aos ITRN foi detectada em dois indivíduos com infecção recente, sugerindo que estes indivíduos apresentavam um pequeno período entre o contágio da infecção e a coleta para o diagnóstico da mesma, visto que esta mutação não persiste por longos períodos em indivíduos não tratados;

- As mutações de resistência associadas aos Inibidores da Protease (IP) foram detectadas em um indivíduo com infecção crônica, revelando baixa prevalência de mutações primárias para esta classe de ARV;
- A prevalência de resistência primária foi semelhante entre os pacientes com infecção recente e crônica, bem como entre os diferentes subtipos do HIV-1 detectados;
- Observou-se uma maior circulação do subtipo B (56,9%) na Região Metropolitana do Recife, seguida do subtipo F(37,7%), com baixa prevalência do subtipo C(3,1%) e de formas recombinantes (2,6%). No presente estudo observou-se alta prevalência do subtipo F diferente de outras regiões, além de uma frequência maior deste subtipo do que a detectada em 2002 em Pernambuco;
- A prevalência da infecção pelo HIV na Região Metropolitana do Recife revelou-se elevada (1,9%) comparando com a média encontrada no Brasil (1%), observando-se maior frequência na cidade do Recife, principalmente na categoria de exposição Homem que faz Sexo com Homem (HSH) ;
- A frequência de infecção recente mostrou-se elevada na Região metropolitana do Recife (23,7%) revelando uma epidemia em ascensão. Não foram encontradas diferenças no que se refere ao sexo e categoria de exposição. A infecção recente predominou nos indivíduos na faixa etária de 25 a 40 anos mas em 30% delas ocorreu em menores de 25 anos;
- A frequência de Homens com infecção recente foi 1,5 vezes maior do que nas mulheres, relação semelhante à descrita pelo Ministério da Saúde para casos de aids no Brasil.

8. RECOMENDAÇÕES

- estudos para monitorar a resistência primária do HIV no estado de Pernambuco devem ser repetidos periodicamente para verificar a tendência desse evento;
- pesquisas para caracterizar molecularmente os subtipos do HIV devem ser ampliadas através de análises filogenéticas e estudo do genoma completo dos subtipos circulantes na RMR, particularmente o subtipo F ;
- recomenda-se direcionar ações de prevenção nos indivíduos mais jovens e no grupo do Homem que faz sexo com homem(HSH) a fim de reduzir novas infecções ;
- realização de novas pesquisas utilizando-se os testes de infecção recente com maior número de amostras e abrangendo novas áreas, inclusive o interior do estado, para verificar a incidência real da infecção pelo HIV no estado de Pernambuco

9. REFERÊNCIAS

APETREI, C.; MARX, P. A.; SMITH, S. M. The evolution of HIV and its consequences. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, Philadelphia, v. 18, p. 369-394, 2004.

ARRUDA E.,SIMÕES L., SUCUPIR C., MEDEIROS M., ARRUDA E., DIAZ R., LIMA A., Intermediate Prevalence of HIV-1 Type Primary Antiretroviral Resistance em Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses** 26:1-3., 2010

BARBOSA JR.A. Desafios para o monitoramento da epidemia de HIV/aids entre os grupos populacionais sob maior risco no Brasil. Tese Doutorado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2008, disponível em <http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/BarbosaJuniorad.pdf>, acesso 18/ janeiro/ 2011.

BÄTZING-FEIGENBAUM, J.; LOSCHEN, S.; GOHLKE-MICKNIS, S.; RAUSCH, M.; HILLENBRAND, H.; CORDES, C.; POGGENSEE, G.; KÜCHERER, C.; HAMOUDA, O. Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: results from a pilot study in Berlin, Germany, in 2005-2007. **HIV Medicine**. V. 10, p. 209-218, 2009.

BARRETO C.C. et. al., Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1 infected blood donors in São Paulo- Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr**. Vol.41(3),pp 388-341, 2006.

BASSICHETTO KC., BERGAMASCH DP., VERAS MA., SUCUPIRA MCA., MESQUITA F., DIAZ, RD., Estimating HIV-1 Incidence Using the Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion at HIV Counseling and Testing Centers in the City of São Paulo ,Brazil. **American Journal of Infectious Diseases** 4(4) :257-261,2008

BENNETT DE, CAMACHO RJ, OTELEA D, KURITZKES DR, FLEURY H, KIUCHI M, HENEINE W, KANTOR R, JORDAN MR, SCHAPIRO JM, VANDAMME AM, SANDSTROM P, BOUCHER CAB, VIJVER D, RHEE SY, LIU TF, PILLAY D, SHAFER RW Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PlosOne** 4: 4724, 2009

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE – Departamento de DST, Aids e Hepatites virais Boletim epidemiológico Aids e DST. **Ministério da Saúde-Brasil**. jan./jun. 2010.

BOLETIM EPIDEMIOLOGICO DST/AIDS – Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco- **Programa Estadual DST/AIDS-Pernambuco**. ano VI, n. 2, setembro 2009

BRITO AM, CASTILHO EA, SZWARCOWALD CL. Aids e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada.**Rev.Soc. Bras.Med.Trop.**34:207-17-2000

BRINDEIRO, R. M. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, Philadelphia, v. 17, n. 10, p. 1-7, 2003.

BRÍGIDO, L.F.M.; NUNES, C.C.; OLIVEIRA, C.M.; KNOLL, R.K.; FERREIRA, J.L. P.; FREITAS, C.A.; ALVES, M.A.; DIAS, C.; RODRIGUES, R. HIV type 1 subtype C and CB pol recombinants prevail at cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AidsResearch and Human Retroviruses**. V. 23 (12), p. 1579-1585, 2007.

BOUCHER C., Cobertura Independente da Conferencia da Clinical Care Options de **16 th International AIDS Conferece**- August 13-18, Canadá, 2006 .

BOWLES E., et al. WATCH: a worldwide database for collection and analysing data on transmission of drug resistant HIV using standardized methods. *Program and abstracts of the 16th International AIDS Conference* ; August 13-18, Toronto, Abstract MOPE 0388, Canadá ,2006.

BONURA F, TRAMUTO F, VITALE F, PERNA AM, VIVIANO E, ROMANO N, for the Group for HIV-1 antiretroviral studies in Sicily, Italy. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 26 (9) 961-965, 2010

CASTELBRANCO EP, SILVA SOUZA E, CAVALCANTI AMS, MARTINS AN, ALENCAS LC, TANURI A. Frequency of primary resistance to antiretroviral drugs and genetic variability of HIV-1 among infected pregnant women recently diagnosed in Luanda- Angola. *AIDS research and Human retroviruses*, 2010

CALYPTE BIOMEDICAL CORPORATION. Bula do fabricante do kit: AwareTM BEDTM EIA HIV-1 Incidence test. Enzyme immunoassay for population estimates of HIV-1 incidence. 2008.

CAVALCANTI AM, LACERDA HR, BRITO AM, PEREIRA S, MEDEIROS D, OLIVEIRA S., Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and suptypes of the Human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast region of Brazil. *Memorias Inst.Oswaldo Cruz* 102:785-92,2007

De CASTRO, CAV., GRINSZTEJN B., VELOS VG., BASTOS, FI., PILOTTO, JH., MORGADO, MG., Prevalence, estimated HIV-1 incidence and viral diversity among people seeking voluntary counseling and testing services in Rio de Janeiro,Brazil. *BMC Infectious Diseases* 10:224 2010

DE SA FILHO DJ, SUCUPIRA MC, CASEIRO MM, SABINO EC, DIAZ RS, JANINI LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:1-13, 2006

CASTILLO J, COMEGNA M, QUIJADA W, JAUVIN V, PINSON P, MASQUELIER B *et al*, Surveillance of HIV type 1 drug resistance among naïve patients from Venezuela , ***AIDS Res Human Retroviruses*** , 2009;25 (12) 1329-1333.

CARDOSO LPV., QUEIROZ BB., STEFANI, MMA., HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West ***Brazil. Journal of Clinical Virology*** 46:134-139, 2009

CARDOSO LP, PEREIRA GA, VIEGAS AA, SCHMALTZ LE, STEFANI MM. HIV-1 primary and secondary resistance antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil ***Brazil. Journal of Clinical Virology*** 82(3):351-7,2010

CDC – USA, 2007. Using the BED HIV-1 capture EIA assay to estimate incidence using STARHS in the context of surveillance in the United States. Updated october, 2007. Disponível em <http://www.cdc.gov/hiv/topics/surveillance/resources>. acesso em 20 de novembro 2009.

CHAIX ML, DESCAMPS D, WIEDEN M, BOCKET L, DELAUGERRE C., TAMAET C., SCHNEIDER V, IZOPET J, MASQUELIER B, ROUZIOUX C, MEYER L, COSTAGLIOLA D, ANRS AC11. Resistance Group: Cohort PRIMO ANRS CO 6;FHDH ANRS C04 Study Group. Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. ***AIDS*** 23:717-24 ,2009

COUTO-FERNANDEZ JC., EYER SILVA WA, GUIMARAES ML, CHEQUER-FERNANDEZ SL, GRINSZTEJN B, DELAPORTE E, PEETERS M, MORGADO M. Phylogenetic Analyses of Brazilian HIV-1 subtype D Strains: Tracing the origin of this subtype in Brazil, ***AIDS Research and Human Retroviruses*** v22-207-211,2006

COUTO FERNANDEZ JC, MORGADO MG, BONGERTZ V, ANDRADE T, BRITES C, CASTRO BG. HIV-1 subtypig in Savador -Bahia: a state with African sociodemographic characeristics **Journal of Aids and Human Retroviroy**, EUA 22 n.3;388-393,1999.

COUTO-FERNANDEZ JC., SILVA-DE JESUS C., VELOSO VG., RACHID M., GRACIE RSG., CHEQUER-FERNANDEZ, SL., OLIVEIRA SM., ARAKAKI SANCHES D, CHEQUER PJN, MORGADO MG. Human immunodeficiency vírus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100; 73-78, 2005

DE BETHUME M.P., HERTOGS, K. Screening and selecting for optimized antiretroviral drugs: rising to the challenge of drug resistance. **Curr Med Res Opin** ; 22: 2603–12,2006.

DIAZ, R. S. *Guia para o manuseio de testes de resistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV-1*. São Paulo: **Abbott**, 2004.

FERREIRA, J. L. P.; THOMAZ, M.; RODRIGUES, R.; HARRAD, D.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA C. A. F.; BATISTA, J. P. G.; ITO, T. S., BRÍGIDO, L. F. M. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. V. 103(8), p.800-808, 2008

FISHER, M.; PAO, D.; MURPHY, G.; DEAN, G.; McELBOROUGH, D.; HOMER, G.; PARRY, J. V. Serological testing algorithm shows rising HIV incidence in a UK cohort of men who have sex with men: 10 years application. **AIDS**. V. 21, p.2309-2314, 2007.

GADELHA, S.R. et al. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency virus -1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 46-464, jun. 2003.

GERETTI A.M. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug naive persons. **Curr Opin Infec Dis** , 20:22-32 , Londres, 2007

GUY, R.J. et al. Improving HIV surveillance in Victoria: the role of the detuned enzyme immunoassay. **J.Acquir.Immune Defic.Sydr**, 138(4)495, Apr, 2005.

GURTLER, L. G. P. H. et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameron. **J. Virology**. Washington, v. 68, p. 1581-1585, 1994.

GUIDELINES for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Dec.2009 <http://www.aids.info.nih.gov/contents>

GUIDELINES EACS 2009. <http://www.europeanaidsclinical-society.org/guidelines>. acesso em 20.09.2010

GUIMARAES ML, EYER-SILVA WA, COUTO-FERNANDEZ JC, MORGADO MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil AIDS (London) v.22;433-435, 2008

GRANGEIRO A, Diagnostico situacional dos Centros de Testagem e Aconselhamento .São Paulo, Instituto de Saúde 2007. Relatório de Pesquisa .Disponível em http://www.aids.gov.br/sites/default/files/relatorio_situacional.cta.pdf. acesso em 12.12.2010.

HAYASHIDA Y, GATANAGA H, TANUMAJ, OKA S., Effects of low HIV type 1 load and antiretroviral treatment on IgG capture BED enzyme immunoassay **AIDS Res.Hum.Retroviruses** 24(3):495-498, 2008

HARGROVE, J. W.; HUMPHREY, J. H.; MUTASA, K.; PAREKH, B. S.; McDOUGAL, J. S.; NTOZINI, R.; CHIDAWANYIKA, H.; MOULTON, L. H.; WARD, B.; NATHOO, K.; ILIFF, P. J.; KOPP, E. Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay. **AIDS**. V.22, p.511-518, 2008. 2009

HALL, H. I.; SONG, R.; RHODES, P.; PREJEAN, J.; AN, Q.; LEE, L. M.; KARON, J.; BROOKMEYER, R.; KAPLAN, E. H.; McKENNA, M. T.; JANSSEN, R. S. Estimation of HIV incidence in the United States. **JAMA**. V. 300, n. 05, p. 520-529, 2008.

HAMMER, S.M., SAAG, M.S., SCHERCHTER, M, et al. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. **JAMA** 296: 827–43,2006

HIGHLYMAN, L Detuned assay used to track recent infections. **BETA**,12(4)6,78, 1999

HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS society-USA Panel. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 37, p. 113-128, Jul. 2003.

INOCENCIO LA, PEREIRA AA, SUCUPIRA MCA, FERNANDEZ JCC, JORGE CP, SOUZA DFC, FINK HT, DIAZ RS, BECKER IM, SUFFERT TA, ARRUDA MB, MACEDO O, SIMAO M, TANURI A. Brazilian Network for HIV Drug Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J.Int. AIDS Soc.** 12:20.2009

JAFFE HW, SCHOCHETMAN G .Group O human Immunodeficiency virus-1 Infections. **Infect. Dis. Clin North Am** 12:3945

JANSSEN et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infections for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. **JAMA**; 280(1);42-8, Jul, 1998.

JOHNSON VA, BRUN-VÉZINET F, CLTET B, GUNTARD HF, KURITZKES DR, PILLAY D, SHAPIRO JM, RICHMAN DD 2008. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: december 2009. **Topics in HIV Med** 17 Issue 5: 138-145. 2009

LAMA JR., SANCHEZ J., SUAREZ L, CABALLERO P, LAGUNA A, SANCHEZ JL, et al. Linking HIV and retroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third sentinel surveillance.. **J. Acquir Immune Defic Syndr** 2006;45:501-505
LITTLE, S. J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 347, n. 6, p. 438-439, Ago. 2002.

LITTLE, S. J. et al. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. **JAMA**, Chicago, v. 282, p. 1142-1149, 1999.

LIMA, K.O., SALUSTIANO DM., CAVALCANTI AMS., LACERDA HL., COELHO R., Estimativa da incidencia de infecção recente pelo HIV-1 em dois Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife -2006/2009
Dissertação de Mestrado-Programa de Pós graduação em Medicina Tropical- UFPE- 2010, in press

LOUWAGIE, J. F. E. et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. **AIDS**, Philadelphia, v. 7, p. 769-780, 1993.

LOS ALAMOS National Laboratory HIV DataBase -HIV Sequence DataBase
<http://hiv-web.lan.org> ; acesso em 20 de outubro 2009

MACHADO, D.M. et al. Use of the sensitive/less sensitive (detuned) EIA strategy for targeting analysis of HIV-1 to recently infected blood donors. **AIDS**, 4;16(1):113-9, Jan 2002.

McDOUGAL JS, PILCHER CD, PAREKH BS, GERSHY-DAMET G, BRANSON BM, MARS, WIKTOR SZ. Surveillance for HIV-1 incidence using tests for recent infection in resource-constrained countries. **AIDS** 2005, 19 (supp 2) :S25-S30

McDOUGAL, J. S.; PAREKH, B. S.; PETERSON, M. L.; BRASON, B. M.; DOBBS, T.; ACKERS, M.; GURWITH, M. Comparison of HIV type 1 incidence observed during longitudinal follow-up with incidence estimated by cross-sectional analysis using the BED capture enzyme immunoassay. **AIDS Research and Human Retroviruses**. V. 22(10), p.945-952, 2006.

MORGADO, M.G. et al Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and indentification of an subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. **J. Acquir. Immune Defic.Syndr.** , Hagerstown, v.18, n.5, p.488-494 – 1998

MEDEIROS L.B. et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,101 Rio de Janeiro, 2006.

MYATT M, BENNET DE A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. **Antivir Ther** 13 suppl 2: 37-48.2009

NDEMBI N. et al, Analyses of drug resistance transmission of acutely non B infected HIV patients in Cameroon. *Program and abstracts of the XVI Interntional AIDS conference* ; August 13-18; Toronto; Abstract THAX010- Canadá- 2006

NESHEIM, S.; PAREKH, B.; SULLIVAN, K.; BULTERYS, M.; DOBBS, T.; LINDSAY, M.; CASHAT-CRUZ, M.; BYERS, B.; LEE, F. Temporal trends in HIV type 1 incidence among inner-city childbearing women in Atlanta: Use of the IgG-capture BED-enzyme immunoassay. **AIDS Research and Human Retroviruses**. V. 21(06), p.537-544, 2005.

OLIVEIRA, C.A.F.; UEDA, M.; YAMASHIRO, R.; RODRIGUES, R.; SHEPPARD, H.W.; BRÍGIDO, L.F.M. Rate and incidence estimates of recent human immunodeficiency virus type 1 infections among pregnant women in São Paulo, Brazil, from 1991 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 43(3), p.1439-1442, 2005.

PAREKH, B. S.; KENNEDY, M. S.; DOBBS, T.; PAU. C.; BYERS, R.; GREEN, T.; HU, D. J.; VANICHSENI, S.; YOUNG, N. L.; COOPANYA, K.; MASTRO, T. D.; McDOUGAL, J. S. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: A simple assay for detection recent HIV infection and estimating incidence. **AIDS Research and Human Retroviruses**. V. 18(04), p.295-307, 2002.

PAREKH, B. S.; McDOUGAL, S. Application of laboratory methods for estimation of HIV-1 incidence. **Indian J Med Res**. 121,p. 510-518, 2005.

PAREKH BS, HANSON DL, HARGROVE J, BRANSON B, GREEN T, DOBBS T, CONSTANTINE N, OVERBAUGH J, McDOUGAL JS. Determination of mean recency period for estimation of HIV type 1 incidence with the BED-Capture EIA in person infected with diverse subtypes. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 26, 2010

PANDO M.A., CARRILLO GC, VIGNOLES M, RUBIO AE, RAMOS FARIAS MS, VILA M, ROSSI D, RALON G, MARONE R, REYNAGA E, SOS J, TORRES O, MAESTRI M, AVILA MM AND SALOMON H. Incidence of HIV-1 Type 1 infection, antiretroviral drug resistance and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina: a global fund Project. **AIDS Research and Human Retroviruses** , 27 (1) 2011

PLANTIER JC, LEOZ M, DICKERSON JE, OLIVEIRA FD, CORDONNIER F, LEMEE V, DAMOND F, ROBERTSON DL, SIMON F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine** 15, 871-872, 2009

PEDROSO C, QUEIROZ AT, ALCANTARA LC, DREXLER JF, DIAZ RS, WEYLL N. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1 infected adults and children in Bahia, a Northeast state of Brazil **J. Acquir Immune Defic Syndr** 45:251-3, 2007

PEREZ L, ALVAREZ LP,, CARMONA R, ARAGONES C, DELGADO E, THOMSON MM et al; Genotypic resistance to antiretroviral drug in patients infected with several HIV type 1 genetic forms in Cuba. **Aids Res Human Retroviruses** 23(2):407-414,2007

PETERSON ML, BOYLE MC, BASTOS FI Assessing HIV resistance in developing countries: Brazil as a case study. **Rev.Panam Salud Publica** 19(3):146-56,2006

PIRES ,I.L. et al. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug naive infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro Brazil. **J.Clin Microbiol** 42(1);426-30.Jan 2004.

QIAMP® VIRAL RNA Mini Handbook for purification of viral RNA (Instruções para uso). QIAGEN second edition –dec.2005

OETTE M, KAISER R, DAUMER M, et al/ Trends of primary drug resistance in crhronically HIV-1 ifected patients in Germany, 2001-2005.**Antivir Ther** 11:S125,2006

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, Washington, v. 288, p. 55-56, 2000.

RODRIGUES, R. et al. Antiretroviral resistance mutations in humkan immunodeficiency virus type 1 infected pacientes enrolled in genoltype testing at Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 97-102, 2005.

RODRIGUES R. et al, Low prevalence of primary resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. **Virus Res** 116(1-2):201-7,2006

SABINO, E. C. et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelop genes recombinant between subtype B and F in Two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J. Virol.**, Washington, v. 68, p. 6340-6346, 1994.

SABINO, F. C. et al. Distribution of HIV -1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo city, Brazil. **AIDS**, Philadelphia, v. 10 p. 1579-1584, 1996.

SHAFFER RW and SCHAPIRO JM. HIV-1 Drug Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. **AIDS** Rev. 10:67-84,2008

SHAFFER RW, RHEE SY, and BENNETT D. Consensus drug resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. **Antiviral Therapy** 13 Suppl 2:53-68 2008

SIMON, F. P. et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nat. Med.**, New York, v. 4, p. 1032-1037, 1998.

VIII SIMPOSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM HIV/AIDS - **SIMPAIDS 2009**- Livro de resumos – Rio de Janeiro, 2009

SOARES et al. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, New York, v. 34, n. 5, Dec. 2003.

SPRINZ E, NETTO EM, LIMA MPJS, FURTADO JJD, EIRA ME, ZAJDENVERG R, MADRUG JV, LEWI DS, MACHADO AA, PEDRO RJ, SOARES MA. Primary

antiretroviral resistance among HIVtype-1 infected individuals in Brazil. ***AIDS Research and Human Retroviruses***, 25(9)861-867, 2009

STANFORD UNIVERSITY. *Stanford Sequence Resistance Database*. Stanford, 2005. Disponível em: <<http://hivdb.stanford.edu>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

SUCUPIRA, MCA. et al. High levels of Primary Antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil ***AIDS Patient Care and STDs.***, n21 v. 2, 2007.

SUCUPIRA MCA, SANABANI S, CORTÊS EM, JANINI LM, SABINO EC, KALLAS EG, DIAZ RS. Primary antiretroviral resistance among individuals with recente infection in the city of São Paulo, Brazil: use of full-length genome sequencing to evaluate six antiretroviral classes. ***Antiviral Therapy*** 14 Suppl 1:A172, 2009

TANURI, A. et al. HIV-1 subtypes among blood from Rio de Janeiro Brazil. ***J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.***, Hagerstown, v. 20, p. 60-66, 1999.

TOZZI V. et al. Drug-class-wide resistance to antiretrovirals in HIV-infected patients therapy: prevalence, risk factors and virological outcome. ***Antivir Ther*** 11: 553–60,2006

TRUGENE® HIV-1 GENOTYPING ASSAY - OPENGENE® DNA SEQUENCING SYSTEM- Instruções para uso – ***Siemens Diagnostics*** -USA

UK Collaborative Group on monitoring the transmission of HIV Drug Resistance. Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infection n the United Kingdom. ***BMJ***, London, v. 322, p. 1087-1088, 2001.

WALTER, A.E., MORGADO, M. A genotyping study of human immunodeficiency virus type -1 drug resistance in a small Brazilian municipality. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, 100, n.8, Rio de Janeiro, dez 2005.

WHEELER W. et al. Antiretroviral drug resistance mutatis and subtypes in drug naive persons newly diagnosed with HIV-1 infection, United States, March 2003 October 2006, *Program and abstracts of the 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infection* , Feb 25-28; Los Angeles, Califórnia. Abstracts 648

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance: selection, evaluation, and implementation. **UNAIDS/01.22E**, 2001

WENSING A.M. Transmission of HIV drug resistance in Europe *Program and abstracts of the XVI International AIDS Conference*, August 13-18; Toronto, Canadá , Abstracts TUAB 0101,2006

YOUNG, B, Carmichael JK, Johnson D, Mills T. PA update: DHHS guidelines for the treatment of HIV infection. **JAAPA** , suppl 1: 3–13, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco – LACEN- PE

Coordenação Estadual DST/Aids – Secretaria de Saúde de Pernambuco

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Depto.de Medicina Tropical

Nome da pesquisa: “Resistência primária aos anti-retrovirais e análise filogenética dos subtipos do HIV-1, em indivíduos com HIV/Aids de Pernambuco”

Pesquisador responsável : Ana Maria Salustiano Cavalcanti - Biomédica -CRBM -0122-PE
LACEN- PE – Praça Oswaldo Cruz-s/n-Recife-PE Fone : 81-34126308

CTA _____ REGISTRO _____

O sr(a) usuário(a) deste Centro de Testagem está sendo convidado a participar de um estudo sobre resistência do vírus aos medicamentos , e da confirmação da sua positividade para o HIV. Este estudo tem a finalidade de confirmar se o sr(a) é realmente positivo para o HIV, e se este vírus que está lhe infectando, apresenta mutações de resistência aos medicamentos usados no tratamento. Os resultados desta pesquisa, assim como outras que estão sendo realizadas no mundo inteiro no combate a aids, poderão auxiliar ações de saúde desenvolvidas pelo Ministério da saúde relacionadas com o controle da aids. O sr(a) poderá recusar-se da pesquisa, caso não tenha sido devidamente esclarecido sobre os objetivos da mesma. Todos os dados são sigilosos e confidenciais e em nenhum momento serão revelados, sendo garantido o total anonimato dos participantes da pesquisa, caso os resultados sejam divulgados ou publicados. Para a realização dos exames , serão coletados com material descartável, cerca de 10 ml do seu sangue por punção da sua veia , de forma convencional. Como em qualquer coleta de sangue pode haver um pequeno desconforto no local da punção, ou o risco da formação de hematomas leves. Após ter lido o texto acima, e ter sido devidamente esclarecido sobre a pesquisa em questão , concordo em participar e assino abaixo este termo de consentimento .

Nome: _____

Assinatura : _____

Investigador responsável : Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Assinatura _____

Testemunhas 1: _____

Testemunhas 2: _____

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

A) DADOS DO PACIENTE :

1-Numero da amostra _____

2- Nome do CTA/Município _____

3- Numero da amostra no CTA _____ 4 -Data da entrada: _____ / _____ / _____

5- Nome do usuário _____

6-Data de nascimento: _____ / _____ / _____ 7-Idade: _____ 8- sexo M () F ()

9-Categoria de exposição _____ 10-Data da sorologia positiva- _____ / _____ / _____

11- Sintomas: sim ____ Não ____ se Sim, quais _____ lgn _____

12- CD 4 basal : _____ cels/mm3 13 - data: _____ / _____ / _____

14-Carga Viral basal: _____ copias/ml 15 -Log _____ 16- data _____ / _____ / _____

B) Dados da GENOTIPAGEM:

17-Data do teste _____ / _____ / _____

18-Amostra amplificada: Sim ____ Não ____ 19-Amostra com mutação: Sim ____ Não ____

20-Amostra com mutação na RT/ITRN: Sim ____ Não ____ se Sim, quais as mutações:

21- Principais _____

22- Secundarias: _____

23-Amostra com mutação na RT/ITRNN: Sim ____ Não ____ se Sim , quais as mutações

24 – Principais _____

25 – Secundarias : _____

26 – outros polimorfismos importantes na RT _____

27-Amostra com mutação na PR: Sim ____ Não ____ se Sim, quais as mutações:

28 – Principais _____

29 – Secundarias _____

30 – outros polimorfismos importantes na PR _____

C) DADOS DA FILOGENIA: 31 - SUBTIPO _____

32-RECOMBINANTE _____ 33 - Método(site) : _____

34- Data da pesquisa no site _____ OBS _____

D) DADOS DO BED- CEIA : 35 – Data do teste : ____ / ____ / ____

36 – Resultado :POSITIVO () NEGATIVO () INCONCLUSIVO ()

NÃO REALIZADO () OBS: _____

Digitado no EpiInfo em ____ / ____ / ____

Ass _____

APÊNDICE C – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

SUBMETIDA À REVISTA :*AIDS Research and Human Retroviruses*

**TRANSMITTED ANTIRETROVIRAL RESISTANCE AMONG INDIVIDUALS
RECENTLY DIAGNOSED WITH HIV/AIDS IN THE METROPOLITAN
REGION OF RECIFE, NORTHEAST OF BRAZIL**

Ana Maria Salustiano Cavalcanti ^{1,2}, Ana Maria de Brito ³, Daniela Medeiros Salustiano ^{2,4}, Kledoaldo Oliveira de Lima ², Sirleide Pereira da Silva ¹, Ricardo Sobhie Diaz ⁵ and Heloisa Ramos Lacerda ²

¹ Virology Sector, Central Public Health Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE), Recife, PE, Brazil

² Postgraduate Program in Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM- FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

⁴ Herbert de Souza Voluntary Counseling and Testing (VCT) Center, Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil

⁵ Infectious Diseases Division, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

This project was partially funded by CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil through the program PROCAD-NF.

+Address correspondence to:

Ana Maria Salustiano Cavalcanti, MsC
Rua Deolinda Francisca de Souza, 217, Janga,
53439-290 Paulista – PE,
e-mail: a_salustiano@yahoo.com.br

Abstract

Investigating antiretroviral resistance among antiretroviral naïve individuals is important for assessing their potential response to first line regimens. The prevalence of primary resistance and occurrence of recent infections among individuals with HIV/AIDS were identified among recently diagnosed patients of five STD/AIDS Testing and Counseling Centers in Metropolitan Region of Recife/Pernambuco, Brazil, between 2007 and 2009. A total of 130 samples were analyzed and processed for the BED Calypte® assay. Males predominated (56%), as did patients 31-50 years of age. Twenty-three percent presented recent HIV infection. The median T CD4+ lymphocyte count was 408 cells/mm³, and the median viral load was 3.7 copies/mL. The prevalence of primary resistance was 4.6% using criteria that excluded common polymorphisms. The prevalence of resistance was 3.8, 1.5 and 0.8% for NNRTIs, NRTIs and PIs, respectively. Fifty-seven percent of strains were from clade B, 37.7% were F and 3.1% were C with no difference in resistance between clades. The growing levels of transmitted antiretroviral resistance and non-B strains in this poorer Brazilian region deserve further attention.

Key words: transmitted antiretroviral resistance, HIV subtype, Brazil, HIV recent infection.

Introduction

In Brazil, antiretroviral therapy has been offered universally and free of charge to HIV-positive individuals since 1997. Currently, about 200,000 people are under antiretroviral treatment. The universal access to antiretrovirals in Brazil has increased survival and improved the quality of life of patients with HIV/AIDS.¹ However, given the sequential use of antiretrovirals in many Brazilian patients and the extensive use of non-boosted protease inhibitors (PIs) in the recent past, it is assumed that a high proportion of patients experience virologic failure and antiretroviral resistance, which can lead to the transmission of resistant strains, which may relate to virologic failure when treatment is started.² The risk that a transmitted virus may be resistant to at least one antiretroviral presents at a significantly varying prevalence, possibly ranging from 2.2 to 24%. This variation is related mostly to the differences in access to therapy (universal versus limited), risk behavior and compliance with treatment.³ In the USA and Europe, the prevalence of transmitted antiretroviral resistant strains is between 5 and 18%, 13.8% in Asia, and between 2.2 and 24% in Africa.⁴ There are also regional variations in the trends of transmitted antiretroviral resistance over time, with some studies demonstrating stability,⁵ increase⁶ or decline.⁷ Thus, local studies may play an important role in determining the prevalence of resistance among patients who have never previously taken antiretrovirals, thereby avoiding erroneous conclusions and their consequences.

In Brazil, HIV/AIDS Voluntary Counseling and Testing (VCT) Centers have been set up in the municipalities that have 70% of AIDS cases. In cities with such Centers, twice as many anti-HIV tests are performed compared to cities that do not have these services.⁸ With the implementation of VCT centers in Brazil, access to anti-HIV tests has increased, and many asymptomatic infected individuals have sought these Centers at earlier stages of the disease to learn about their HIV status.⁸ Investigating the HIV molecular epidemiology of samples from seropositive individuals who have been diagnosed at VCT centers may be of fundamental importance in understanding the details of each localized epidemic in a given Brazilian region.

Recife is the capital of the State of Pernambuco in the Northeast Region of Brazil. It is an urban area with 3.6 million people (7.4 million in the state of Pernambuco). The northeast region of Brazil is considered less developed than the

southeast and southern regions of the country and is experiencing a growing prevalence of AIDS and higher AIDS-related mortality rates compared to the southern regions.⁹ In Pernambuco, there are 23 VCT centers located at strategic points in the Metropolitan Region of Recife at selected clinics that had a large demand for anti-HIV testing. Most of these sites have specialized outpatient clinics supported with resources from the Department of STD/AIDS and Viral Hepatitis of the Brazilian Ministry of Health 2010.

In this study, we sought to characterize individuals infected by HIV who had been recently diagnosed at the five most important VCT centers in the Metropolitan region of Recife.

Material and methods

The users of the VCT centers selected for this study (Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista and Recife) were diagnosed as HIV-positive by two different ELISA assays and one positive confirmatory test (immunofluorescence or western blot assay). When they returned to the centers to receive their results, they were informed about this study during the post-test counseling. Those who agreed to participate signed the informed consent and underwent blood sampling for HIV characterization and performance of *BED-Calypse*. Together with the specific form for the project, the samples were sent to the Virology Sector of LACEN-PE and stored at -70°C.

Between July 2007 and March 2009, 210 samples were collected from individuals who were recently diagnosed with HIV-1 and had never received antiretroviral treatment. Of these, 130 plasma samples had a portion of the HIV-1 genome sequenced. Viral RNA was extracted using the QIAmp® RNA minikit (Qiagen, Germany). For RNA transcription to cDNA, PCR amplification with genetic sequencing of the product was performed using the TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics, USA). This genotyping assay detects genomic HIV mutations in the protease (codons 1 to 99) and the reverse transcriptase (codons 10 to 297) regions of the *pol* gene. The genetic sequences generated were analyzed using the OpenGene® DNA Sequencing System (Siemens Diagnostics, USA). ARV resistance mutations and subtypes were submitted to the Stanford HIV Drug Resistance Database available at <http://hivdb.stanford.edu>, and subtypes were

further confirmed by SIMPLOT version 2.¹⁰ The mutations were compiled based on the lists compiled by the Surveillance Drug Resistance Mutation criteria (SDRM), which excludes common polymorphisms in the evaluation of transmitted HIV antiretroviral resistance.¹¹ The *BED Calypte*® assay (Calypte Biomedical Corporation) was carried out in accordance with the manufacturer's instructions for serological differentiation between recent (RS) and longterm seroconverters (LTS).

The patients' socio-demographic and laboratory data were retrieved from the sample referral records sent from the VCT center to the Virology Sector of the Central Public Health Laboratory of Pernambuco, based on the user history provided by the SIREX database (Laboratory Test Result System). The viral load and T CD4+ lymphocyte count were retrieved from the SISCEL (Brazilian System of Laboratory Examinations Control).

All relevant data in the study were transcribed to a specific individual questionnaire for the project and were double-entered into the EPIINFO version 6.0 software and into Microsoft Office Excel v. 2007. The study was approved by the Ethics in Research Committee of the Federal University of Pernambuco (protocol CEP/CCS/UFPE nº 120/07).

Results

Patients' characteristics are depicted in Table 1. Enough samples were available from 108 individuals for testing for recent HIV infection, which revealed a prevalence of recent infection of 23.1%. The prevalence of primary resistance was 6.1% based on the IAS (2008)¹² table of mutations and 4.6% based on SDRM (2009)¹¹. Subtype B was the most prevalent (56.9%) in the study population, followed by subtype F (37.7%), subtype C (3.1%) and subtype B/F (2.3%).

The mutations associated with resistance to reverse transcriptase inhibitors and to protease inhibitors that were found among eight patients in the study are detailed in Table 2, which also depicts the socio-demographic and laboratory data.

There were no statistically significant differences between socio-demographic and laboratory characteristics of the population diagnosed with recent HIV infection and those with chronic HIV infection, between individuals with and without resistance or between individuals infected by different HIV-1 subtypes. When the characteristics

of the population were analyzed according to the observed subtypes in this study, no statistically significant differences were found.

Discussion

The prevalence of primary resistance to antiretrovirals observed in this study was 4.6% when using the SDRM criteria, which exclude common polymorphisms.¹¹

Due to the high cost of monitoring antiretroviral resistance by means of genotyping, the World Health Organization recommends that surveillance of such resistance in small geographical areas should be stratified, with the application of a sequential sampling method called threshold surveying of HIV resistance, thus enabling the use of a small set of samples ($n \leq 50$). This method classifies HIV resistance into three categories: low ($\leq 5\%$), moderate (5 - 15%) and high ($\geq 15\%$) prevalences.¹³

In Brazil, two major studies on the prevalence of HIV primary resistance were published in 2009. The first was comprised of 400 participants from 13 Brazilian cities. It is worth noting that only one center, Salvador (in the northeastern region), was located outside the southern and southeastern regions and that 220 samples originated from the state of São Paulo. Using the IAS criteria, the prevalence of individuals with the virus who presented resistance mutations was 5.7%.¹⁴ In the present study, with samples from the Metropolitan Region of Recife, the observed prevalence of resistance mutations was 6.1% using the IAS criteria, which was very similar to the rate in the study by Sprintz et al.¹⁴

One evaluation carried out at a national level was the National Network for the Surveillance of Drug Resistance in Brazil (HIV-BResNet), which was published in 2009. This study included 210 recently diagnosed individuals from six state capitals in Brazil, of which two were in the Southeast (São Paulo and Rio de Janeiro), one in the South (Porto Alegre), one in the Midwest (Brasília), one in the North (Belém) and one in the Northeast (Salvador), and it classified the mutations according to SDRM. In this study, 8.1% of the isolates contained resistance mutations. The levels of resistance in São Paulo, Rio de Janeiro (both southeast regions) and Belém (North region) were intermediate (between 5 and 15%), whereas the levels were low ($< 5\%$) in Brasília (Central region), Porto Alegre (South region) and Salvador (Northeast region).¹⁵

Using the SDRM criteria, the present study showed that 4.6% of the strains had resistance mutations, which coincides with the low resistance prevalence that has been detected outside the southeastern region, which is the epicenter of the HIV epidemic in Brazil.¹⁵ However, even with levels that are considered low, the prevalence of resistance to drugs appears to have increased in the present study region, because the rate found here was slightly higher than that detected in Pernambuco in 2002, which was 3.6%.¹⁶

In the northeastern region, the states of Bahia and Ceará have issued recent data on resistance to drugs. The HIV BRestNet study showed that Salvador had a low rate of resistance to drugs, namely less than 5%.¹⁵ A study conducted in Ceará found an intermediate rate of resistance, 9.5%,¹⁷ which was higher than in the two major Brazilian studies that included states outside the southeastern region. Considering the differences found between the studies, as well as the similarities and proximity of the three northeastern capitals, one needs to determine precisely the composition of the populations in each study. It should be noted that the sample of the present study, which was exclusively recruited at VCT centers from among individuals with recently diagnosed HIV and which presents a prevalence of recent infection of 23%, faithfully reflects the percentage of virus circulating in the general population infected by HIV in this region. There is also the possibility that real differences in the prevalence of resistance may occur, as regional variations do exist.

From the analysis in the present study using the SDRM criteria, 3.84% of the mutations observed were associated with NNRTI, 1.53% with NRTI and 0.77% with PI, which is a similar profile to what has been demonstrated recently in Brazil^{14,15} and elsewhere.¹⁸

From the analysis of the frequency of mutations associated with each class of antiretrovirals, we found that there were more mutations associated with NNRTI, which was absent in an older study carried out in Pernambuco in 2002¹⁶ or at a National level.¹⁹

Regarding NRTI, unlike in other studies, two of our samples had the 184V mutation and only one sample had the 215F mutation. It is important to emphasize that the 184V mutation occurred in two individuals with recent infection, which may explain its presence as there is a trend for this mutation to become undetectable over time among individuals infected with antiretroviral resistant strains.²⁰

The present study showed a high prevalence of recent infections (23%), but there were no significant differences in the prevalence of mutations between the recent and long-standing infected population (Fischer exact test, $p = 0.327$). Two samples with recent infections and two samples with chronic infections presented NNRTI-related mutations, while the mutations relating to NRTI only occurred in the group of recent infections (in two samples). The only sample with a mutation related to PI occurred among the patients with chronic infections. These findings probably reflect the greater circulation of NNRTI resistance strains due to NNRTI being generally used in first line regimens in Brazil.²¹ The results may also be due to a lack of fitness cost in viruses presenting these specific mutations.²²

As has been observed in all regions of Brazil, except the South, there was a predominance of HIV subtype B. However, in the present study, a high percentage of subtype F was detected (37.7%) circulating in the metropolitan region of Recife. This rate was much higher than that generally observed in other regions of the country. Additionally, it appears that there may be a trend towards an increase in the circulation of subtype F in this specific region, which was already high (26%) in the study carried out in Recife in 2002.¹⁶

It is interesting to note that although subtype B prevails in Brazil, there is a trend toward an increasing prevalence of subtype C in southern Brazil,¹⁵ an epidemic of BF recombinant strains that includes CRFs 28 and 29 in around 50% of infected individuals in the port city of Santos in the Southeast Brazilian region (home for high levels of transmitted resistance as well),^{23,24} and a trend towards increased prevalence of subtype F in the northeast region of the country.^{15,17} Nonetheless, our results demonstrate the higher prevalence of the F subtype in a Brazilian survey analyzing just this small genomic region. It is of note that resistance-related mutations may vary among different subtypes in Brazil,²⁵ and studies targeting non-B strains surely deserve further attention.

We recognize that the small sample size analyzed in this study and the small genomic HIV region characterized here may preclude more definitive information. However, we suspect that a "microepidemic" of subtype F is occurring in this region and that the transmitted resistance profile and prevalence may be changing in this region, thus deserving future evaluations for trends.

Table 1. Socio-demographic and laboratory characteristics of the study population from Recife

Characteristics	Total	Individuals with primary resistance			
		IAS		SDRM	
Total	130	8	(6,1%)	6	(4,6%)
Age group					
Under 30 years	57 (43,8%)	5	(62,5%)	5	(83,3%)
31 to 50 years	65 (50,0%)	3	(37,5%)	1	(16,7%)
51 years or over	8 (6,2%)	-	-	-	-
Sex					
Male	69 (53,1%)	5	(62,5%)	5	(83,3%)
Female	61 (46,9%)	3	(37,5%)	1	(16,7%)
VCT of origin					
Recife	12 (9,2%)	-	-	-	-
Olinda	9 (6,9%)	-	-	-	-
Paulista	27 (20,8%)	2	(25%)	2	(33,3%)
Jaboatão	28 (21,5%)	2	(25%)	1	(16,7%)
Cabo	54 (41,5%)	4	(50%)	3	(50,0%)
Exposure category*					
MSM	21 (16,2%)	1	(50%)	1	(50%)
HTS/male	46 (35,3%)	4	(50%)	4	(50%)
HTS/female	52 (40,0%)	2	(66,7%)	1	(33,3%)
HIV+ partner	11 (8,5%)	1	(100%)	-	-
HIV Subtype					
B	74 (56,9%)	6	(75%)	5	(83,3%)
F	49 (37,7%)	2	(25%)	1	(16,7%)
C	4 (3,1%)	-	-	-	-
BF	3 (2,3%)	-	-	-	-
Recent infection**					
Positive	25 (23,1%)	1	(25%)	2	(50%)
Negative	83 (76,9%)	3	(75%)	2	(50%)
CD4(cels/ml)***					
Median	408	470		428	
Interquartile interval	195 – 693	332 – 544		256 – 635	
Viral load (copies/ml)***					
Median	3.683	17.671		53.259	
Interquartile interval	208 – 24.224	4.095 – 67.776		20.947 – 179.220	

HTS: Heterosexual MSM: Men who have sex with other men

* The responses were not mutually exclusive.

** 22 samples were not tested (16.9%): of these, three patients had primary resistance according to IAS and two patients according to SDRM.

*** For 34 patients, there was no information on the T CD4 lymphocyte count and viral load.

Table 2. Individuals with drug resistance mutations

VCT-sample	Sex	Age	Exposure category	Sub type	Mutations			Recent infection	CD4/ Viral load
					ITRN	ITRNN	IP		
Cabo-24913	F	25	Partenr HIV+	B	-	108I*	-	-	480/1.093
Cabo-29524	M	27	MSM	F	-	103N	-	NEG	-
Cabo-14149	M	26	HTS	B	184V	101E, 190S	-	POS	-
Cabo-93	M	32	HTS	B	184V, 215F, 219N	103N, 106I, 230L	-	POS	566/470000
Jaboatão-36720	F	45	HTS	F	-	108I*	-	NEG	460/1.754
Jaboatão-37415	M	30	HTS	B	-	-	46I, 73S, 82A, 90M	NEG	842/82.294
Paulista-14785	M	47	HTS	B	-	190A	-	-	155/11.119
Paulista-16350	F	32	HTS	B	-	225H	-	-	290/24.224

NEG – Negative; POS – Positive.

* Mutation related to resistance only in the IAS classification

References

- 1-Teixeira PR, Vitoria MA, Barcarolo J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS* 2004;18(suppl 3):5-7.

- 2-Gagliani LH, Maia WTA, Sá-Filho D, Sucupira MC, Caseiro MM, Diaz RS. The association between primary antiretroviral resistance and HAART virologic failure in a developing set. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.

- 3-Paredes R, Lalama CM, Ribaud HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguel F, Meyer WA 3rd, Johnson VA, Fiscus SA, D'Aquila RT, Gulick RM, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team. Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis* 2010;201:662-71.

- 4-Ceccherini-Silberstein F, Cento V, Calvez V, Perno C-F. The use of human immunodeficiency virus resistance tests in clinical practice. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1511-1517.

- 5-Chaix ML, Descamps D, Wirden M, Bocket L, Delaugerre C, Tamalet C, Schneider V, Izopet J, Masquelier B, Rouzioux C, Meyer L, Costagliola D; ANRS AC11 Resistance Group; Cohort PRIMO ANRS CO 6; FHDH ANRS CO4 Study Groups. Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. *AIDS* 2009;23:717-24.

- 6-Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, Mahle KC, Heneine W, Johnson JA, Hall HI; Variant, Atypical, and Resistant HIV Surveillance Group 2010. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, USA. *AIDS* 2006; 24:1203-12.

- 7-Bracciale L, Colafigli M, Zazzi M, Corsi P, Meraviglia P, Micheli V, Maserati R, Gianotti N, Penco G, Setti M, Di Giambenedetto S, Butini L, Vivarelli A, Trezzi M, De Luca A 2009. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1-infected

patients in Italy: evolution over 12 years and predictors. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:607-15.

8-Grangeiro A. Diagnóstico situacional dos Centros de Testagem e Aconselhamento. São Paulo, Instituto de Saúde, 2007. Available at http://www.aids.gov.br/sites/default/files/relatorio_situacional_cta.pdf, 2010. Accessed 12 January 2011.

9-Brazilian Ministry of Health. Boletim epidemiológico de Aids e DST, ano VII, no. 1, Brasília 2010, 21p. Available at: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010_preliminar. Accessed 17 January 2011.

10-Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999;73:152-60.

11-Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme AM, Sandstrom P, Boucher CAB, Vijver D, Rhee SY, Liu TF, Pillay D, Shafer RW. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PlosOne* 2009;4:4724.

12-Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Shapiro JM, Richman DD 2008. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: december 2008. *Topics in HIV Med* 2008;16:138-145.

13-Myatt M, Bennet DE 2009. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antivir Ther* 2009;13 (suppl) 2:37-48.

14-Sprinz E, Netto EM, Lima MP, Furtado JJ, Eira M, Zajdenverg R, Madruga JV, Lewi DS, Machado AA, Pedro RJ, Soares MA. Primary antiretroviral drug resistance

among HIV type 1- infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:861-867.

15-Inocência LA, Pereira AA, Sucupira MCA, Fernandez JCC, Jorge, CP, Souza DFC, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simão M, Tanuri A 2009. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 2009;12: 20.

16-Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AMS, Albuquerque MFPM. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 2006;101:845-849.

17-Arruda E, Simões L, Sucupira C, Medeiros M, Arruda E, Diaz R, Lima A 2010. Intermediate Prevalence of HIV Type 1 Primary Antiretroviral Resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 1-3.

18-Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, et al. Antiretroviral drug susceptibility and response to initial therapy among recently HIV-infected subjects in North America. *Antiviral Ther* 2001;6(suppl 1): 21.

19-Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Soares MA, Cavalieri E, Fernandez J, Rodrigues R, Lauria C, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A, and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): results from the first national survey. *AIDS* 2003;17:1063-1069.

20-Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Diaz RS, Kallas EG, Janini LM, Liegler T, Pilcher CD, Grant RM, Cortes R, Deeks SG, Hecht FM. Differential Persistence of Transmitted HIV-1 Drug Resistance Mutation Classes. *JID* in press.

21-Brazilian Ministry of Health. *Recomendações para uso da terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes com HIV/AIDS*. 7^a. Ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2008.

22-Nicastri E, Sarmati L, de'Ettorre G, Pamisano L, Parisi SG, Uccella I, Rianda A, Concia E, Vullo V, Vella S, Andreoni M. Replication capacity biological phenotype, and drug resistance of HIV strains isolated from patients failing antirretroviral therapy. *J Med Virol* 2003;69: 1-6.

23-Sucupira NCA, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC, Castelo A, Page-Shafer K, Diaz RS. High Levels of Primary Antiretroviral Resistance Genotypic Mutations and B/F Recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care and STDs* 2007;21:42-54.

24-Teixeira D, Munerato P, Komninakis SC, Fusuma EE, Janini LM, Sucupira MC, Diaz RS. The detection of in vivo and in vitro HIV-1 B/F profiles in Brazil using a realtime PCR assay for five HIV-1 genomic regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26:1-10.

25-Munerato P, Sucupira MC, Oliveros MP, Souza DF, Pereira AA, Janini LM, Inocência LA, Diaz RS. HIV-1 Antiretroviral resistance mutations in subtypes B, C and F in the city of Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010, 26(3):265-73.

APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS**SUBMETIDA À REVISTA : *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*****RECENT INFECTION OF HIV IN RECIFE - PE****RECENT HIV INFECTION AND PREVALENCE IN THE METROPOLITAN REGION OF RECIFE, PERNAMBUCO**

Ana Maria Salustiano Cavalcanti^{1/2/+}, Ana Maria de Brito³, Daniela Medeiros Salustiano^{2/4}, Kledoaldo Oliveira de Lima², Sirleide Pereira da Silva¹, Heloisa Ramos Lacerda²

¹Setor de Virologia, Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE), R. João Fernandes Vieira, 50050-210, Recife, PE, Brasil ²Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil ³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM- FIOCRUZ), Recife, PE, Brasil ⁴Centro de Testagem e Aconselhamento DST/Aids Herbert de Souza, Cabo de Santo Agostinho, PE, Brasil

+Corresponding author:

Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Rua Deolinda Francisca de Souza, 217, Janga.

53439-290 Paulista – PE,

e-mail: a_salustiano@yahoo.com.br

Financial support: Coordenação Estadual DST/Aids de Pernambuco – Secretaria de Saúde - PE- Plano de ações e metas 2008/2009; Programa Nacional de Cooperação Acadêmica – Ação Novas Fronteiras (Procad – NF) – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Educação, Brasil.

ABSTRACT

The BED Capture enzyme immunoassay test makes it possible to determine whether individuals were infected recently for HIV. In this study, the HIV prevalence and frequency of recent infection among individuals with HIV/AIDS was determined at five Voluntary Counseling and Testing (VCT) centers, in the Metropolitan Region of Recife, Northeastern of Brazil. On 46,696 individuals, the overall prevalence of HIV infection was 1.96%, with the highest prevalences in Recife (3.9%). The prevalence was higher among males (3.93%), men who have sex with men (MSM) (12.4%) and individuals over 40 years of age (2.72%). The frequency of recent infections among 169 subjects was 23.7%. Recent infections were more common among individuals under 25 years of age and in the municipalities of Recife (35.7%) and Cabo de Santo Agostinho (31.2%). There was slight predominance of men and higher frequency of heterosexuals in both groups, but still a significant portion of MSM (33%). Subtype B predominated, followed by a high proportion of subtype F. We conclude that early infection occurs mainly among younger individuals and heterosexuals, despite significant frequency among MSM. The research results suggest that prevention for MSM remains a challenge and efforts focusing this population should continue to be a priority.

Keywords: HIV, recent infection, BED, prevalence, VCT.

Introduction

Differing methodologies have been used in epidemiological surveillance of HIV/AIDS infection around the world, to assess and improve the monitoring of trends within the epidemic. Most of the epidemiological data available are based on cross-sectional prevalence studies, which vary considerably in terms of local conditions, study populations and the methodology used. The epidemiological and virological characteristics of the HIV epidemic in Brazil also vary according to the regions and populations studied. The Brazilian Ministry of Health's National Department for STD/AIDS and Viral Hepatitis has estimated that around 630,000 individuals in this country are infected (Ministério da Saúde 2010).

The Brazilian epidemic is considered by the World Health Organization to be concentrated, i.e. there is low prevalence among the general population and very much higher prevalences among groups at risk, particularly men who have sex with men (MSM), sex workers and injected drug users (IDUs) (UNAIDS 2010). In Brazil, the prevalence rate for HIV infection is less than 1% in the general population and has remained stable since 2004. However, among groups with heightened risk of infection, HIV prevalence rates of around 5.9% were detected among IDUs, 10.5% among MSM and 5.1% among female sex workers in a study conducted in ten Brazilian state capitals between 2008 and 2009 (Barbosa 2009). In Brazil, the AIDS epidemic has particular regional characteristics and the AIDS incidence rates have shown a trend towards stabilization, with decreases in the southeastern and central-western regions and increases in the northern, northeastern and southern regions (Brito et al 2005, Ministério da Saúde 2010).

On the other hand, measurements on the incidence of HIV infection may provide information with greater detail for monitoring the epidemic. Such measurements thus become an important tool for identifying groups that present greater vulnerability to infection, and they may be used to direct prevention and control programs (McDougal et al 2005).

Tests to detect recent HIV infection are being used in scientific studies to calculate the rate of new HIV infection. In 1998, the Centers for Disease Control (CDC) produced standardized methodology for identifying recent HIV-1 infections, based on a serological test algorithm known as **STARHS** (Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion) (Janssen et al 1998). In 2001, Parekh et al developed a new

methodology called the IgG BED capture enzyme immunoassay (CEIA) (Biomedical Corporation, USA), based on detection of increasing proportions of specific IgG after seroconversion. The antigens used in this method are peptides derived from the immunodominant region of gp41, containing sequences of subtypes B, E and D, which are representative of many subtypes of HIV-1 (Parekh and McDougal 2001, Parekh et al. 2002). This assay has the capacity to determine what percentage of a population of HIV-infected individuals was infected within the last six months prior to the date of sample collection, provided that this is done in conjunction with the patients' clinical and epidemiological data. It should not be used routinely for diagnosing HIV infection. Quantitative tests determine the HIV-specific IgG in relation to total serum IgG and make it possible to calculate the increase in specific IgG that takes place at the start of the HIV infection. This increase is gradual and, over a period of usually up to 160 days, values that are detectable in the traditional tests are still not reached. This period is thus considered to be the "window" period for seroconversion. The test presents sensitivity of 81.7% and specificity of 89.1% for identification of incident samples. The gold standard used is the documented seroconversion, and test performance is unaffected by HIV-1 diversity (Parekh and McDougal 2001).

Parekh and McDougal (2005) demonstrated that among different populations such as IDUs or pregnant women, or even on stored frozen serum samples, the BED-CEIA test was capable of consistent results for epidemiological surveillance studies. It would thus make it possible to ascertain trends in incidence level variation if samples from different years were available for testing.

In Brazil, where the AIDS epidemic has regional characteristics, several studies on recent infection have also been conducted. Bassicheto et al. (2009) analyzed the proportion of recent infection in some Voluntary Counseling and Testing (VCT) centers in the city of São Paulo, and found a rate of recent infection of 15% among 194 individuals who were tested using the Vironostika-Biomerieux assay. They found that recent infections were more frequent among younger individuals (under 25 years of age). In Curitiba, among 32 HIV-positive samples analyzed by Ferreira et al. (2008) using the BED-CEIA assay, recent infection was identified in 25% of the cases, and subtype C was found to be the commonest type among these recent infections (63%). In Ceará, in samples collected in 2008/2009, a rate of recent infection of 6.8% was found among 74 patients who had never previously had antiretroviral treatment, who were attended at two STD/AIDS referral hospitals in that

state (Arruda et al. 2010). A study in Rio de Janeiro, on 434 frozen samples that were collected at three VCT in the metropolitan region between November 2004 and October 2005, found a rate of recent infection of 14% by means of BED-CEIA (de CASTRO et al. 2010).

VCT have been established to improve the access to testing, thereby stimulating early diagnosis and treatment of HIV infection, and are distributed throughout the national territory. In Pernambuco, there are 24 VCT across the state, of which five are located at strategic points within the metropolitan region of Recife (RMR), where there is greater demand for HIV testing because of convenient location and easy access. Most individuals who go to the VCT are asymptomatic but are exposed to some risk of contracting the infection. Thus, VCT are excellent places for detecting new cases of HIV infection; they provide a new technique representing an advance towards revealing recent infection and they are places serving large numbers of pregnant women who go there to have a prenatal anti-HIV test (Ministério da Saúde 2008).

The aims of the present study were to describe the prevalence of HIV infection at five VCT in the metropolitan region of Recife, over the period from July 2007 to April 2009; to determine the frequency of recent infection among individuals who were recently diagnosed as seropositive for HIV-1 and to compare the sociodemographic and laboratory characteristics of individuals with recent and established infection.

Material and methods

A cross-sectional study was conducted among users of five VCT in the metropolitan region of Recife, in the municipalities of Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista and Recife, who were recruited between July 2007 and April 2009. Individuals returning to the VCT to receive recent test results for whom the result was a diagnosis of HIV infection in accordance with the guidelines of the Brazilian Ministry of Health (www.aids.gov.br) were presented with the aims of this study at the post-test counseling session. Those who agreed to participate in the study signed a free and informed consent statement and underwent blood sample collection for specific laboratory tests. These samples were sent to the Virology Sector of the Central Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE), accompanied

by the specific form for this project. They were centrifuged and the plasma was stored at -70°C for subsequent processing.

Samples from 169 individuals who fulfilled the inclusion criteria of the study (recent diagnosis of HIV-1 infection and no previous antiretroviral treatment) were analyzed. The BED-CEIA test (BED-Calypte®) was used to detect recent infection. Controls (negative, strongly positive and weakly positive) and the calibrators were tested together with the samples, in accordance with the manufacturer's instructions (Calypte Biomedical Corporation, Oregon, USA). The results from the samples were assessed in terms of optical density (OD), such that values ≤ 1.2 were taken to be positive and, after repetition in triplicate, samples were considered to be cases of recent infection when $OD \leq 0.80$.

The anti-HIV test results used in the HIV infection prevalence study and the sociodemographic data on the individuals tested were obtained from the database of each VCT and from the users' histories issued by the SIREX database (laboratory test result system of the State of Pernambuco STD/AIDS Coordination Office). The viral load results and CD4 T lymphocyte counts were retrieved from the SISCEL database (laboratory test control system of the National Department for STD/AIDS and Viral Hepatitis). The data on the individuals tested for recent infection were transcribed to a specific individual form for the project and were double-entered into the Epi-Info software version 6.0 and into Microsoft Office Excel spreadsheets (2007 version). The study was approved by the ethics committee of the Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, under registration number CEP/CCS/UFPE 120/07-SISNEP FR-134429.

Results

According to the data obtained from SIREX for the period from July 2007 to April 2009, 46,696 individuals were tested and 916 individuals tested positive. Thus, the general prevalence was 1.96%. The prevalence of HIV infection ranged from 1.2 to 3.9% at the five VCT, and it was highest at the VCT in Recife (3.9%) and Jaboatão dos Guararapes (2.2%). Among the individuals tested for recent infection, the overall rate of positive findings was 23.7%, and the rate was highest in the municipalities of

Recife (35.7%), Cabo de Santo Agostinho (31.2%) and Jaboatão dos Guararapes (23.0%) (Table I).

Information about sex, age group and exposure category of the individuals tested at the VCT in the municipalities of Cabo de Santo Agostinho, Olinda and Jaboatão dos Guararapes is presented in Table II. It was found that the great majority of the individuals tested were female and under the age of 25 years. On the other hand, the rate of positive findings was greater among males (3,9%) than among females (0,8%). The prevalence of infection was higher among MSM (12,4%) than among heterosexual subjects (1.4%), and among individuals over 40 years of age (2.7%) than among younger individuals.

Out of the 169 individuals who underwent the BED-CEIA test to determine whether their infection was recent or chronic, 40 (23.7%) were classified as presenting recent infection or recent seroconversion (RS). The variables of sex and exposure category did not present any statistically significant differences in relation to condition of HIV infection. However, the individuals with recent infection were younger than those with chronic infection ($p < 0.05$). It was observed that the rate of positive findings of infection was higher in the heterosexual group, but the rate of recent infection in the MSM group was 37,5%. The median CD4 lymphocyte count in the individuals with recent infection was 560 cells/mm³, versus 409 cells/mm³ in the individuals with chronic infection. The median viral load was 795 copies of RNA/ml in the patients with recent infection, versus 8,540 copies of RNA/ml in the patients with chronic infection, without any significant difference between the two groups. The molecular characterization of the samples to verify the viral subtypes did not show any difference between the two groups. Subtype B was seen to have the greatest circulation, followed by subtype F (Table III).

The geographical locations of the five VCT studied can be seen in Figure 1. The distribution of the data on the prevalence of HIV infection and frequency of recent infection showed that these were highest in Recife, followed by the municipalities of Jaboatão dos Guararapes and Cabo de Santo Agostinho.

Discussion

The present study revealed that the overall prevalence of HIV infection among the individuals tested at five VCT in the metropolitan region of Recife between 2007 and 2009 was 1.96%. The highest prevalences were in Recife (3.9%) and Jaboatão dos Guararapes (2.2%). The prevalence was higher among men; in the exposure category of MSM (12.4%); and in the age group over 40 years. The overall frequency of recent infection among the 169 individuals was 23.7%. Comparison between individuals with recent versus chronic infection showed that recent infection was more frequent among individuals under 25 years of age and in the municipalities of Recife (35.7%), Cabo de Santo Agostinho (31.2%), Jaboatão dos Guararapes (23%), which are in the south of the metropolitan region. There was slight predominance among men and greater frequency among heterosexuals in the two groups, but there was still a significant proportion of MSM (37.5%). There was similarity between the viral subtypes, with predominance of subtype B, although with a high proportion of subtype F (around 40%), both in cases of recent infection and in cases of chronic infection.

This study presents data from VCT located in five populous municipalities in the greater metropolitan region of Recife, which has a total of 3,042,426 inhabitants. Recife is the capital of the state of Pernambuco, located in the northeastern region of Brazil, which is one of the poorest and most populous regions of Brazil. The rate of recent infection of 23.7% indicates that this epidemic is still growing in the metropolitan region. The data show that Recife is the municipality with the highest prevalence of diagnosed infection and highest frequency recent infection, among the five municipalities evaluated. This finding is in agreement with data from the Brazilian Ministry of Health (2010), which indicate that Recife ranks fourth among Brazilian cities in terms of the incidence of AIDS cases, with 58.4 cases/100,000 inhabitants, whereas in 1999, the incidence was 20.4 cases/100,000 inhabitants. (Ministério da Saúde 2010). On the other hand, municipalities located in the south of the metropolitan region have also evolved with high frequencies of recent infection, as is the case of Cabo de Santo Agostinho (31.2%) and Jaboatão dos Guararapes (23%). This differs from municipalities located on the northern part of the coast, such as Olinda and Paulista, which presented rates of recent infection of 10 and 12.5%, respectively. It needs to be emphasized that the state of Pernambuco has been

experiencing significant economic growth(GDP), with an increase in GDP of 9.3% in 2010. This growth has occurred mainly as a result of greater activity in the Port of Suape and the industrial center and shipbuilding industry located in the municipality of Cabo de Santo Agostinho, with migration of young male workers from all over the state and even from southeastern Brazil (Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco 2011). Although this is positive from an economic point of view, it may have been reflected in the increased HIV infection rate.

With regard to sex, it was observed that while large numbers of women underwent the test, infection was found predominantly among men. The large numbers of women tested was primarily due to the characteristics of VCT in Brazil, which are places that are recommended for HIV testing for pregnant women. The participation by pregnant women may have reduced the prevalence of infection among the women, which was only one quarter of the rate seen among the men, given that many women who were not in a situation of risk were probably included. On the other hand, the men who sought the VCT possibly did so because they were at greater risk of exposure. However, the evaluation relating to recent infection showed that the frequency among the men was only 1.5 times higher than that of the women. This is in agreement with the frequencies of AIDS cases notified to the Ministry of Health in 2010 and other recent years, which showed a ratio of 1.5 men to each woman with AIDS in Brazil over the last decade (Ministério da Saúde 2010).

With regard to exposure category, the sexual route predominated, with a significant proportion of heterosexuals, both in cases of recent infection and in cases of chronic infection. However, the characteristic of a concentrated epidemic (i.e. with groups at higher risk) still seems to be occurring, given that in evaluating both the prevalence and the recent infection, MSM constituted a significant proportion of the infected individuals. This group presented an infection rate that was nine times greater than that of heterosexuals and comprised one third of the men with recent infection.

Whereas the prevalence study showed higher prevalence of infection in age groups over 40 years, the recent infections showed a trend towards new cases among younger individuals (under 25 years of age). In fact, while developed countries are moving towards infection at more advanced ages (UNAIDS 2010), the situation in Brazil is that younger age groups in poorer regions are where the numbers of AIDS cases are advancing significantly and affecting individuals who

started to have a sex life at an early age, without safe sexual practices, and with the loss of large numbers of productive years (Bastos et al. 2008).

The laboratory tests showed that the patients generally presented a low stage of immunosuppression, with median CD4 lymphocyte counts greater than 400 cells/mm³ and viral loads less than 10,000 copies, both in cases of recent infection and in cases of chronic infection. These findings emphasize the importance of seeking testing centers at earlier stages, which gives rise to reduced transmission and better therapeutic results. However, this contrasts with the time at which individuals present themselves for medical care in the northeastern region, i.e. generally at a late stage and with advanced immunosuppression (Grangeiro et al. 2011, Melo et al 2008). Failures of post-test guidance regarding the benefits of early medical follow-up, or difficulties in accessing medical care are important factors in this disparity between the time of diagnosis at the VCT and the presentation for medical care previously described in Brazil (Ministério da Saúde 2008).

There was no great variation in viral subtypes found, between the recent and chronic infections, with predominance of subtype B followed by subtype F. Differing from the southern region, the frequency of subtype C remained low in both groups (less than 5%). However, it was seen that the frequency of subtype F was very high: around 32% in cases of recent infection and 42.2% in cases of chronic infection. This was very high compared with findings in other regions of Brazil, and even in relation to other states in the northeastern region, thus showing that the circulation of this subtype in Recife was differentiated.

The main limitation of this study related to the lack of separate analysis on the pregnant women, in calculating the prevalence of HIV infection. This was because of the difficulty in obtaining this information from the SIREX database of the VCT. Another limitation was the small number of samples tested to determine the cases of recent and chronic infection, thus impeding the calculation of the incidence. However, this was an analysis on a very populous region, with large numbers of individuals tested, in an area with a growing epidemic and sparse published data on the topic. We consider that this study may enrich the discussion on the best strategies for preventing HIV infection in localities at greater risk and among younger individuals presenting greater vulnerability.

Acknowledgements

We thank the teams at the participating VCT, especially João Carlos da Silva, Daniela Salustiano, Rejane Marquim, Kledoaldo Lima and Regineide Albuquerque. We thank Dr. Cecília Sucupira and Dr. Ricardo Diaz of UNIFESP, for their review of the genetic sequences and suggestions. We thank the State of Pernambuco STD/AIDS Coordination Office, especially François Figueiroa and Adriana Cavalcanti.

TABLE I

Prevalence of HIV-1 at five VCT in the metropolitan region of Recife and samples tested to detect recent infection, for the period from July 2007 to April 2009.

VCT	Number of samples			Prevalence (%) 95% CI	Number of samples	
	Tested for HIV	Positive	Negative		Tested using BED	Recent infection
OLINDA	9297	119	9178	1.27 1.06 – 1.53	20	2 (10%)
CABO	11440	148	11292	1.29 1.09 – 1.52	64	20 (31.2%)
JABOATÃO	11519	256	11263	2.2 1.96 – 2.51	39	9 (23%)
PAULISTA	6544	81	6463	1.23 0.98 – 1.54	32	4 (12.5%)
RECIFE	7896	312	7584	3.9 3.53 – 4.40	14	5 (35.7%)
TOTAL	46696	916	45780	1.96 1.84 – 2.09	169	40 (23.7%)

TABLE II

Prevalence of HIV-1 at three VCT^a located in the metropolitan region of Recife, according to sex, age group and exposure category, for the period from July 2007 to April 2009.

Variables	Number of samples tested	HIV-positive samples			p-value
		Number	%	95% CI ^b	
Total	32,256	523	1.62	1.48 – 1.76	-
Sex					
Male	6,718	264	3.93	3.48 – 4.42	< 0.001
Female	29,538	259	0.88	0.77 – 0.99	
Exposure category					
HTS ^c	30,156	445	1.48	1.34 – 1.62	< 0.001
MSM ^d	427	53	12.4	9.43 – 15.9	
Age group					
Under 25 years	16,161	132	0.82	0.68 – 0.97	< 0.001
25 to 40 years	11,877	276	2.32	2.06 – 2.61	
Over 40 years	4,218	115	2.72	2.26 – 3.26	

a: VCT: Cabo de Santo Agostinho, Olinda and Jaboatão dos Guararapes.

b: CI = confidence interval; c: HTS = heterosexual; d: MSM = men who have sex with men

TABLE III

Population characteristics according to condition of HIV infection.

Characteristics	Recent infection		Chronic infection		Total		p-value
	n	%	n	%	n	%	
Total	40	23.7	129	76.3	169	100.0	
Age group							
Under 25 years	12	30.0	15	11.6	27	16.0	0.011
25 to 40 years	23	57.5	80	62.0	103	60.9	
Over 40 years	5	12.5	34	26.4	39	23.1	
Sex							
Female	16	40.0	60	46.5	76	45.0	0.470
Male	24	60.0	69	53.5	93	55.0	
Exposure category							
Male							
MSM	9	37.5	18	26.1	27	29.0	0.569
Heterosexual	15	62.5	51	73.9	66	71.0	
Female							
Heterosexual	16	100.0	60	100.0	76	100.0	-
Originating TCC							
Cabo	20	50.0	44	34.1	64	37.9	0.114
Jaboatão	9	22.5	30	23.2	39	23.1	
Olinda	2	5.0	18	14.0	20	11.8	
Paulista	4	10.0	28	21.7	32	18.9	
Recife	5	12.5	9	7.0	14	8.3	
CD4 (cells/ml)							
Median (P ₂₅ ; P ₇₅)	560 (119; 884)		409 (215; 672)		418 (208; 696)		0.376
Viral load (copies/ml)							
Median (P ₂₅ ; P ₇₅)	795 (179; 39.174)		8.540 (208; 39.121)		7.491 (198; 39.147)		0.421
HIV subtype							
B	15	60.0	44	53.0	59	54.6	0.796
F	8	32.0	35	42.2	43	39.8	
C	1	4.0	2	2.4	3	2.8	
BF	1	4.0	2	2.4	3	2.8	

** Association between recent infection and exposure category, independent of sex

References

Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco. Desempenho do produto interno bruto de Pernambuco no 4º. trimestre e no ano de 2010. [cited 2011 Mar 09] Available from: <http://www2.condepefidem.pe.gov.br/web/condepeFidem>.

Arruda E, Simões I, Sucupira MC, Medeiros M, Diaz R, Lima A 2010. Intermediate prevalence of HIV type 1 Primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2000. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 207-217.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2005. Regional patterns of the temporal evolution of the AIDS epidemic in Brazil following the introduction of antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis* 9: 9-19.

Barbosa JRA. Desafios para o monitoramento da epidemia de HIV/aids entre os grupos populacionais sob maior risco no Brasil, PhD Thesis, [thesis on the internet] Tese Doutorado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2008; [cited 2011 Jan 18]. Available from: <http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/BarbosaJuniorad.pdf>.

Bastos FI, Caceres C, Galvão J, Veras MA, Castilho EA 2008. AIDS in Latin America: assessing the current status of the epidemic and the ongoing response. *Int J Epidemiol* 27: 729-737.

Bassicheto K.C.; Bergamaschi DP, Veras MA, Sucupira MCA, Mesquita F, Diaz RS 2009. Estimating HIV-1 incidence using the serological testing algorithm for recent HIV infection at HIV counseling and testing centers in the city of São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 13: 9-12

Calypte Biomedical Corporation. Calypte® HIV-1 BED Incidence EIA (IgG-Capture HIV-EIA) Package Insert. Available from: <http://www.calypte.com/products/inserts/bedmsds-ln-20500-02.pdf>.

CDC – USA 2007. Using the BED HIV-1 capture EIA assay to estimate incidence using STARHS in the context of surveillance in the United States. Updated october, 2007. [cited 2010 Dez 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/hiv/topics/surveillance/resources/factsheets/pdf/bed.pdf>.

De Castro CAV, Grinsztejn B, Veloso VG, Bastos FI, Pilotto JH, Morgado MG 2010. Prevalence, estimated HIV-1 incidence and viral diversity among people seeking voluntary counseling and testing services in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis* 10: 224. doi: 10.1186/1471-2334-10-224.

Ferreira JLP, Thomaz M, Rodrigues R, Harrad D, Oliveira ACM, Oliveira CAF, Batista JPG, Ito TS, Brígido LFM 2008. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 800-808.

Grangeiro A, Escuder MM, Menezes PR, Alencar R, Ayres de Castilho E 2011. Late entry into HIV care: estimated impact on AIDS mortality rates in Brazil, 2003-2006. *PLoS One*. 6(1): e14585.

Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, Hecht FM, Jack N, Cleghorn FR, Kahn JO, Chesney MA, Busch MP 1998. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates. *JAMA* 280: 42-48.

McDougal JS, Pilcher CD, Parekh BS, Gershy-Damet G, Branson BM, Marsh K, Wiktor SZ 2005. Surveillance for HIV-1 incidence using tests for recent infection in resource-constrained countries. *AIDS* 19: 25-30.

Melo LS, Lacerda HR, Campelo E, Moraes E, Ximenes RA 2008. Survival of AIDS patients and characteristics of those who died over eight years of highly active

antiretroviral therapy, at a referral center in northeast Brazil. *Braz J Infect Dis.* 12: 269-77.

Ministério da Saúde do Brasil. Boletim epidemiológico de Aids e DST, ano VII, no.1, Brasília, 2010 [cited 2011 Jan 10]. Available from: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010preliminar>.

Ministério da Saúde do Brasil - Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais. Contribution of the Test and Counselling Centers to Universalize the Diagnosis and Guarantee the Equality in the Access to the Services. *Ministério da Saúde* 2008

Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau C, Byers R, Green T, Hu DJ, Vanichseni S, Young NL, Coopanya K, Mastro TD, McDougal JS 2002. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: A simple assay for detection recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 295-307.

Parekh BS, McDougal S 2005. Application of laboratory methods for estimation of HIV-1 incidence. *Indian J Med Res.* 121: 510-518.

Programa Estadual Dst/Aids – Pernambuco 2009. Boletim informativo – DST/AIDS. Ano IX, n.02.

UNAIDS 2011. UNAIDS report on the global aids epidemic 2010. [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.unaids.org/globalreport/Globalreport.htm>.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 134/2007 - CEP/CCS

Recife, 11 de junho de 2007

Registro do SISNEP FR – 134429

CAAE – 0120.0.172.000-07

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 120/07

Título: “Resistência primária aos anti-retrovirais e análise filogenética dos subtipos dos HIV-1 em indivíduos com HIV/AIDS de Pernambuco ”

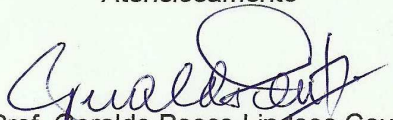
Pesquisador Responsável: Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 06 de junho de 2007.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CER/CCS / UFPE

A

Doutoranda Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – CCS/UFPE

ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA DO LACEN-PE

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO - SES
GERÊNCIA GERAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA – LACEN
“Dr. Milton Bezerra Sobral”

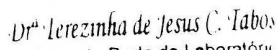
**CARTA DE ANUÊNCIA**

Recife, 11 de maio de 2007.

Declaro, para os devidos fins, ter lido o projeto de tese de Doutorado da funcionária desta Instituição, **ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI**, intitulado **“RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTI RETROVIRAIS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS SUBTIPOS DO HIV-1 EM INDIVÍDUOS COM HIV/AIDS DE PERNAMBUCO”**, que deverá ser executado no que se refere aos exames laboratoriais nas instalações do Setor de Virologia do LACEN-PE, onde a mesma trabalha. Declaro igualmente, estar de acordo com as proposições do projeto descritas no projeto original, a mim apresentado.


Dra. Terezinha Tabosa

Gestora da Rede dos Laboratórios Públicos do Estado


Gestora da Rede de Laboratórios
Público Estadual - PE
11/05/2007

ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DA Coordenação Estadual DST-AIDS de PERNAMBUCO



Secretaria de Saúde de Pernambuco
Gerência de Acompanhamento e Políticas de Saúde
Unidade de Atenção à Tuberculose, Hanseníase, Hepatites, DST/AIDS
Programa Estadual DST/AIDS



CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins, ter lido o projeto de tese de doutorado da funcionária da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, lotada no LACEN-PE, ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI intitulado “RESISTÊNCIA PRIMARIA AOS ANTI RETROVIRAIS E ANALISE FILOGENETICA DOS SUBTIPOS DO HIV-1 EM INDIVIDUOS COM HIV/AIDS DE PERNAMBUCO”, estando de acordo com as proposições do projeto descrito no projeto original a mim apresentado, apoiando no que for necessário para a execução do mesmo, no que se refere aos procedimentos que serão realizados nos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) do estado de Pernambuco selecionados para o referido estudo.

DR. FRANÇOIS FIGUEIROA

Nome

COORDENADOR DO PROGRAMA DST/AIDS DE PERNAMBUCO

Cargo/função

Assinatura

François Figueirôa
Matrícula 233738-0
Coord. do Programa Estadual DST/AIDS
Séc. de Saúde/PE

Carimbo da instituição

ANEXO D – TABELA DE MUTAÇÕES DO IAS- *International AIDS Society*

Special Contribution – December 2009 Resistance Mutations Update Volume **17** Issue **5** December **2009**

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS^{a,p,q}

Atazanavir +/- ritonavir ^r	L 10 I F V C	G 16 E R M I T V	K 20 I	L 24	V 32 I F V	L 33 Q I L V	E 34 I	M 36	M 46 L	G 48 V	I 50 L	F 53 L Y	I 54 V M T A	D 60 E	I 62 V	I 64 L M V	A 71 V C S T A	G 73	V 82 A T F I	I 84 V V	I 85 V	N 88 S	L 90 M	I 93 L M
Darunavir/ ritonavir ^r	V 11 I				V 32 I F	L 33			I 47 V		I 50 V	I 54 M L					T 74 P V	L 76		I 84 V		L 89 V		
Fosamprenavir/ ritonavir	L 10 F I R V				V 32 I				M 46 L	I 47 V		I 50 V	I 54 L V M				G 73 S	L 76 V	V 82 A F S T	I 84 V		L 90 M		
Indinavir/ ritonavir ^t	L 10 I R V	K 20 M R	L 24		V 32 I	M 36 I			M 46 L			I 54 V				A 71 V S T	G 73 A	L 76 V I	V 77 A	I 82 F T	I 84 V	L 90 M		
Lopinavir/ ritonavir ^u	L 10 F I R V	K 20 M R	L 24		V 32 I F	L 33			M 46 L	I 47 V		I 50 V	I 53 L V L A M T S			L 63 P	A 71 V S T	G 73 V	L 76 V	V 77 A F T S	I 82 V	I 84 V	L 90 M	
Nelfinavir ^{tv}	L 10 F I				D 30 N	M 36 I			M 46 L								A 71 V T	V 77 I	V 82 A	I 84 V	N 88 D	L 90 S M		
Saquinavir/ ritonavir ^t	L 10 I R V		L 24						G 48 V		I 54 V		I 62 V			A 71 V S T	G 73 V	V 77 I	V 82 A	I 84 V	L 90 M			
Tipranavir/ ritonavir ^w	L 10 V	I 13 V	K 20 M R		L 33 F	E 35 G	M 36 I		K 43 T	M 46 L	I 47 V		I 54 A M V	Q 58 E		H 69 K	T 74 P	V 82 L	N 83 D	I 84 V	L 90 M			

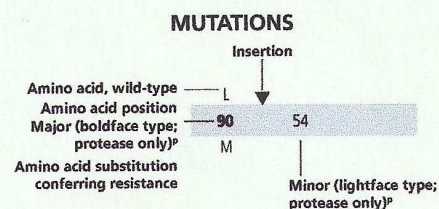
MUTATIONS IN THE ENVELOPE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ENTRY INHIBITORS

Enfuvirtide ^x	G 36 D S	I 37 V	V 38	Q 39	Q 40	N 42	N 43
Maraviroc ^y	See User Note						

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE INHIBITORS

Raltegravir ^z	Y 143 R H C	Q 148 H K R	N 155 H
--------------------------	-------------------------	-------------------------	---------------

Amino acid abbreviations: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.



ANEXO D – TABELA DE MUTAÇÕES DO IAS- *International AIDS Society*

International AIDS Society–USA *Topics in HIV Medicine*

MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)^a

Multi-NRTI Resistance: 69 Insertion Complex^b (affects all NRTIs currently approved by the US FDA)

M	A	▼	K	L	T	K
41	62	69	70	210	215	219
L	V	Insert	R	W	Y	Q
					F	E

Multi-NRTI Resistance: 151 Complex^c (affects all NRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)

A	V	F	F	Q
62	75	77	116	151
V	I	L	Y	M

Multi-NRTI Resistance: Thymidine Analogue-Associated Mutations^{d,e} (TAMs; affect all NRTIs currently approved by the US FDA)

M	D	K	L	T	K
41	67	70	210	215	219
L	N	R	W	Y	Q
				F	E

Abacavir ^{f,g}	K	L	Y	M
	65	74	115	184
	R	V	F	V

Didanosine ^h	K	L
	65	74
	R	V

Emtricitabine	K	M
	65	184
	R	V
		I

Lamivudine	K	M
	65	184
	R	V
		I

Stavudine ^{d,e,g,i,j,k}	M	K	D	K	L	T	K
	41	65	67	70	210	215	219
	L	R	N	R	W	Y	Q
						F	E

Tenofovir ^l	K	K
	65	70
	R	E

Zidovudine ^{d,e,j,k}	M	D	K	L	T	K
	41	67	70	210	215	219
	L	N	R	W	Y	Q
					F	E

Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{a,m}

Efavirenz	L	K	K	V	V	Y	Y	G	P
	100	101	103	106	108	181	188	190	225
	I	P	N	M	I	C	L	S	H
						I	A		

Etravirine ⁿ	V	A	L	K	V	E	V	Y	G	M
	90	98	100	101	106	138	179	181	190	230
	I	G	I	E	I	A	D	C	S	L
				H			F	J	A	
				P			T	V		

Nevirapine	L	K	K	V	V	Y	Y	G
	100	101	103	106	108	181	188	190
	I	P	N	A	I	C	C	A
				M		I	L	H

ANEXO E – TABELA DE MUTAÇÕES DA OMS – SDRM – 2009

HIV Surveillance Mutations

Table 4. Protease Inhibitor (PI) Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) List: 40 Mutations at 18 Positions*

Position	AA	New	Lists	A (%)	AE (%)	AG (%)	B (%)	C (%)	D (%)	F (%)	G (%)	No Rx (%)	Max Rx (%)
<i>Number of individuals:</i>				1,528	902	1,437	7,439	2,182	515	598	619	15,220	7,886
23	I	✓	3	0.1	0.1	0	0	0	0	0	0	0.1	2.1
24	I		5	0	0	0.1	0	0	0	0.2	0	0.2	11
30	N		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.0
32	I		5	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0.1	7.3
46	I		5	0.3	0.6	0.1	0.4	0.2	0	0.2	0	0.6	29
	L	✓	5	0.3	0.2	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2	0.5	0.5	13
47	V		5	0	0	0	0	0.1	0.2	0	0.3	0.3	6.8
	A		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
48	V		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.7
	M	✓	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.3
50	V		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5
	L		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8
53	L		5	0	0.1	0	0	0	0	0	0.2	0.2	7.8
	Y	✓	4	0.1	0	0.1	0	0	0	0	0	0.1	0.6
54	V		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.3
	L		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.6
	M		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.3
	A		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.6
	T		5	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.1	1.7
	S		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.7
73	S		5	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0.1	13
	T		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.3
	C		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0
	A		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8
76	V	✓	5	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0.1	4.3
82	A		5	0	0	0	0	0.1	0	0.2	0	0.2	30
	T		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
	F		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.1
	S		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6
	C	✓	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8
	M		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5
	L	✓	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
83	D	✓	3	0	0	0.1	0	0.1	0	0	0	0.1	9.3
84	V		5	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0.1	21
	A		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8
	C		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8
85	V	✓	4	0.1	0	0.1	0.1	0.2	0	0.2	0	0.2	6.4
88	D		5	0	0.1	0.1	0.1	0	0	0	0.2	0.2	6.4
	S		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.4
90	M		5	0.1	0.3	0	0.1	0.1	0	0	0.5	0.5	45
<i>Sum of Prevalences:</i>				1.1	1.5	1.1	1.0	1.0	0.4	1.2	1.2		

Abbreviations: Pos – amino acid position; AA – amino acid difference from consensus B; Lists – Number of mutation lists with the mutation; New – mutations not present on the 2007 SDRM list; No Rx – highest prevalence in untreated persons in any of the 8 listed subtypes; Max Rx – Prevalence of the mutation in the subtype with the highest prevalence of the mutation provided the mutation is present in viruses from two or more individuals. Underlined bold mutations are those with a prevalence >0.5% that are nonetheless included because the >0.5% prevalence occurs in only one subtype with fewer than 1000 sequences or in fewer than 1000 sequences available for analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0004724.t004

ANEXO E – TABELA DE MUTAÇÕES DA OMS – SDRM – 2009

Table 2. Nucleoside RT Inhibitor Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) List: 34 Mutations at 15 Positions

Position	AA	Lists	New	A (%)	AE (%)	AG (%)	B (%)	C (%)	D (%)	F (%)	G (%)	No Rx (Max %)	Max Rx (%)
<i>Number of individuals:</i>				1,305	770	1,035	5,672	2,020	324	265	403	11,586	14,621
41	L	5		0	0.3	0.1	0.3	0	<u>1.2</u>	0	0	1.2	39
65	R	5		0.1	0	0	0	0.2	0	0	0	0.2	6.5
67	N	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	44
	G	4		0	0	0.1	0.2	0.1	0	0	0	0.2	1.6
	E	3	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.7
69	D	4		0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.1	7.1
	ins	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.2
70	R	5		0	0.3	0	0.2	0	0	0	0	0.3	29
	E	5	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6
74	V	5		0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2	7.5
	I	4	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3
75	M	4		0	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	3.8
	T	4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.7
	A	3		0	0	0	0	0.1	0	0	0	0.1	0.8
	S	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.4
77	L	3		0	0.3	0	0.1	0	0	0	0	0.3	2.0
115	F	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.4
116	Y	3		0	0.1	0	0	0	0	0	0	0.1	3.3
151	M	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.2
184	V	5		0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	<u>0.6</u>	0	0	0.6	61
	I	5		0	0.3	0.1	0	0	0.3	0	0	0.3	2.8
210	W	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
215	Y	5		0.2	0	0	0	0	0	0	0	0.2	38
	F	5		0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.1	22
	I	3		0.2	0.1	0	0	0	0	0	0	0.2	5.7
	S	3		0	0.1	0.1	0.4	0	0	0.4	0	0.4	0.6
	C	3		0	0	0	0.2	0	0	0	0	0.2	3.1
	D	3		0	0	0	0.4	0	0.3	0	0	0.4	0.8
	V	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0
	E	3		0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.1	2.1
219	Q	5		0.2	0.4	0.4	0	0	0	0	0	0.4	25
	E	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.4
	N	4	√	0.1	0.4	0.2	0.1	0	0	0	0	0.4	2.5
	R	4		0.2	0	0.1	0.1	0.1	0	0	0	0.1	2.2
<i>Sum of Prevalences:</i>				1.4	2.9	1.3	2.3	0.6	2.4	0.4	0.2		

ANEXO E – TABELA DE MUTAÇÕES DA OMS – SDRM – 2009

Table 3. Non-Nucleoside RT Inhibitor Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) List: 19 Mutations at 10 Positions

Position	AA	Lists	New	A (%)	AE (%)	AG (%)	B (%)	C (%)	D (%)	F (%)	G (%)	No Rx (Max %)	Max Rx (%)
<i>Number of individuals:</i>				1,305	770	1,035	5,672	2,020	324	265	403	11,784	14,621
100	I	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.4
101	E	5		0	0	0	0.2	0	0	0	0	0.2	6.4
	P	5	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.4
103	N	5		0.1	0	0.2	0.3	0.2	0	0	0	0.3	40
	S	4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
106	M	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
	A	5		0	0	0.1	0	0	0	0	0	0.1	1.1
179	F	5	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2
181	C	5		0.1	0.1	0.1	0	0.1	0	0	0	0.1	14
	I	5		0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.1	1.1
	V	5	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.1
188	L	5		0	0.3	0	0	0	0	0	0	0.3	2.4
	H	5		0	0	0	0.1	0	0.3	0	0	0.3	0.6
	C	5		0	0	0.1	0	0	0	0	0	0.1	0.9
190	A	5		0.1	0	0	0	0.1	0.3	0	0	0.3	10
	S	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6
	E	4		0	0	0.1	0	0	0	0	0	0.1	0.5
225	H	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.6
230	L	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.6
<i>Sum of Prevalences:</i>				0.4	0.4	0.6	0.7	0.5	0.6	0	0		