

**Secretaria de Estado da Saúde  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização  
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

**Graziele Sanches dos Santos**

**MONITORAMENTO IMUNOLÓGICO NA HISTÓRIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1**

**São Paulo, SP**

**2019**

**Graziele Sanches dos Santos**

**MONITORAMENTO IMUNOLÓGICO NA HISTÓRIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1**

*Trabalho de conclusão de curso de Especialização, apresentado ao Instituto Adolfo Lutz - Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP Doutor Antônio Guilherme de Souza, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública*

*Orientador: Profa. Dra. Marisa Ailin Hong*

**São Paulo, SP**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Grazielle Sanches dos

Monitoramento imunológico na história da infecção pelo HIV-1/ Grazielle Sanches dos Santos– São Paulo, 2019.

37 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Citometria de Fluxo e Biologia Molecular aplicadas ao monitoramento da infecção pelo HIV-1

Orientação: Profa. Dra. Marisa Ailin Hong

1-HIV; 2-Citometria de fluxo; 3-Monitoramento imunológico; 4-Protocolos clínicos

SES/CEFOR/IAL-37/2019

## RESUMO

Os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) são documentos oficiais baseados em evidências científicas, elaborados com o objetivo de garantir melhor cuidado à saúde do paciente ou usuário do SUS, por meio de determinação de critérios para efetuar o diagnóstico da doença ou do agravo à saúde, tratamento e acompanhamento dos pacientes. Em 2013, o Ministério da Saúde (MS) atualizou o PCDT para o manejo da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) em adultos. E a principal alteração foi quanto à frequência de solicitação dos exames de quantificação de linfócitos T-CD4+ em pacientes clinicamente estáveis. Em razão disso, este trabalho propôs fazer uma breve revisão da literatura para entender a importância da realização do exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ no monitoramento do indivíduo infectado pelo HIV-1 e o impacto da alteração no PCDT na rotina laboratorial, publicado pelo MS. A quantificação de linfócitos T-CD4+ tem grande importância no monitoramento do estado imunológico do paciente, visto que o HIV afeta principalmente as células do sistema imunológico, em especial os linfócitos T-CD4+. Entretanto, pela observação feita no trabalho de rotina de quantificação de linfócitos T-CD4+ do Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto Adolfo Lutz (CF-IAL), entende-se que de fato é desnecessária a realização deste exame a cada 3 ou 4 meses, como preconizava o PCDT anterior, em pacientes que apresentam condições clínicas e laboratoriais estáveis. Isto porque as alterações relativas, e também as absolutas, dos linfócitos T-CD4+ não são observadas até que alguma das condições mencionadas sofra alteração. Esta observação corrobora com o que determina o PCDT de 2013, pois representa uma redução em torno de 50% no número de exames realizados no CF-IAL, e que gera um grande impacto econômico. Entretanto, acredita-se que a decisão de simplesmente não realizar o exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ para pacientes com valor de CD4 acima de 350 células/uL, carga viral indetectável e clinicamente assintomático, seja uma determinação muito radical. Neste contexto, de acordo a opinião feita como autora dessa monografia, cabe a liberdade ao médico clínico em solicitar a realização deste exame, não somente quando há alteração em um dos três critérios, mas conforme julgamento do profissional, como por exemplo, avaliação para indicação de vacina ou mesmo de outros critérios médicos.

**Palavras chaves:** HIV, Protocolos Clínicos, Citometria de Fluxo, Monitoramento

## **ABSTRACT**

Clinical Protocols and Therapeutic Guidelines (CPTG) are the official documents, which are based on the scientific evidence, and they are elaborated with the objective of ensuring the best care to the patient health or to the user of the SUS (*National Health System*) users. Criteria were established by determining the diseases diagnosis or the health injury, and to the patients treatment and follow-up. In 2013, the Ministry of Health (MH) updated the CPTG for managing the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in adults. The main change was on the frequency in requesting the laboratory testing for CD4<sup>+</sup> T- lymphocytes counting in clinically stable patients. In 2013, the MH updated the CPTG for managing the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in adults. The main change occurred in the frequency for requesting the T lymphocytes (T-Ly) and CD4 + quantification in blood samples from clinically stable patients. In 2013, the MH updated the CPTG for managing the HIV-1 infection in adults. The main change was on the frequency in requesting this laboratory testing to the clinically stable patients. For this reason, a brief review was written to present the importance of performing the T-Ly and CD4<sup>+</sup> cells quantifications, for monitoring the individuals infected with HIV-1. The impact of this change was taking into considered by the CPTG. This review was published by the MH, for being put into the laboratory routine work. The T-Ly and T-CD4<sup>+</sup>Ly counting are crucial for monitoring the immunological status of the patient, since the HIV primarily infects the cells of immune system, in particular the T-CD4<sup>+</sup>Ly. For this reason, a brief review of the literature was performed in the present study, to understand the significance of performing the assays for quantifying the total T-Ly and CD4<sup>+</sup> cells, for monitoring the HIV-1-infected individuals. Also the impact of the change on the CPTG in the laboratory routine was evaluated. The quantification of total T-Ly and T-CD4<sup>+</sup>Ly cells is highly important for monitoring the patient immunological status, since the HIV primarily infects the immune system cells, particularly the T-CD4<sup>+</sup>Ly. However, by observing the routine T-CD4<sup>+</sup>quantification, performed at the Flow Cytometry Laboratory of Instituto Adolfo Lutz (CF-IAL) – São Paulo, SP, it might say that it is unnecessary to perform this exam every 3 or 4 months, as earlier advocated by the CPTG, in patients who present the stable clinical and laboratory conditions. And the related and also absolute amendments, for T-Ly and CD4<sup>+</sup> T-Ly counts are not observed until some changes occur in the mentioned conditions.

**Key words:** HIV, Clinical Protocols, Flow Cytometry, Monitoring

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. PROPOSTA DO TRABALHO .....</b>	<b>8</b>
<b>3. HIV E A EPIDEMIA NO BRASIL E NO MUNDO.....</b>	<b>9</b>
<b>4. INFECÇÃO PELO HIV-1 E A CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES.....</b>	<b>11</b>
<b>5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV .....</b>	<b>18</b>
5.1 Testes de triagem.....	19
5.2 Testes confirmatórios e/ou complementares.....	20
<b>6. MONITORAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV .....</b>	<b>21</b>
6.1 Rede Nacional de Laboratórios para contagem de linfócitos T-CD4+.....	22
6.1.1 Técnicas para quantificação de Linfócitos T-CD4+ .....	23
6.2 Rede Nacional de Laboratórios para quantificação de carga viral de HIV ...	26
6.2.1 Técnica para quantificação de carga viral .....	27
6.3 Rede de Laboratórios de genotipagem - RENAGENO.....	28
6.3.1 Técnicas Aplicadas para Genotipagem do HIV-1 .....	29
6.4 Protocolos Terapêuticos.....	30
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No início da década de 1980, uma nova doença caracterizada por uma imunodeficiência foi descrita e observada entre indivíduos homossexuais, usuários de drogas injetáveis, hemofílicos e transfundidos. Segundo UNAIDS 77,3 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, Human Immunodeficiency Virus:), causador desta doença, chamada de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome). E desde o início da epidemia, foram registradas 35,4 milhões de mortes associadas à AIDS desde então (UNAIDS, 2018).

Apesar dos primeiros casos de AIDS terem sido descritos nos Estados Unidos, os maiores números de pacientes registrados ao longo do tempo foi em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, em particular naqueles localizados no continente Africano (Silva & Mata, 2011; UNAIDS, 2018).

No Brasil, de 2007 a junho de 2018, foram notificados aproximadamente 247.795 casos de infecção pelo HIV, dos quais 47,4% são residentes na região Sudeste. De 1980 a junho de 2018, foram identificados 926.742 mil casos de AIDS, com maior concentração de casos nas regiões Sudeste (51,8%) e Sul (20%) do Brasil (Ministério da Saúde, 2018a).

Desde a descoberta do HIV, já se passaram mais de 35 anos de estudos, com grandes avanços no entendimento da classificação do vírus (HIV-1 e HIV-2), da patogênese da infecção (especialmente para HIV-1) e no desenvolvimento de mais de 20 tipos de medicamentos, com grande eficácia no controle da replicação viral e, conseqüente, diminuição dos sintomas e aumento da sobrevida dos pacientes (Montaner *et al.*, 2010; Piot & Quinn, 2013).

As medidas preventivas por meio da educação, do uso de preservativos ou pelo uso de drogas antirretrovirais pré- (PREP) e pós-exposição (PEP), entre outros, representam, até o momento, as medidas de maior eficácia no controle da infecção pelo HIV-1, atenuação da transmissibilidade do vírus (Wawer *et al.*, 2005; Johnston & Fauci, 2007; Tonks, 2007; Lawn & Meinties, 2011).

Apesar de terem havido todos estes avanços, com conseqüente redução de novas infecções em vários países do mundo, incluindo a África do Sul, e aumento da expectativa de vida, os líderes mundiais consideram que a infecção por HIV-1 ainda

merece atenção, justificada pelo aumento de deslocamento de pessoas ao redor do mundo, alterações climáticas e uma expectativa econômica incerta (UNAIDS, 2016).

Diante disso, o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) definiu em 2014, como parte da Declaração de Paris, a meta 90-90-90. Foram convidadas todas as cidades dos diversos países a enfrentarem mais efetivamente a infecção pelo HIV, de maneira que possam imaginar a erradicação da epidemia por volta do ano de 2030. Em outras palavras, a meta é de diagnosticar 90% dos indivíduos vivendo com HIV, tratar 90% dos indivíduos vivendo com HIV e diagnosticados, e observar a redução da carga viral a níveis indetectáveis em pelo menos 90% dos indivíduos em tratamento (UNAIDS, 2015).

No Brasil, os documentos conhecidos como Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), são elaborados com a participação de hospitais, sociedades médicas e sistemas públicos de saúde desde a década de 70 e, visam garantir o melhor cuidado à saúde do paciente usuário do Sistema Único de Saúde (SUS). Estes documentos, elaborados com base em evidências científicas, levam em consideração a eficácia, a segurança e o custo-efetividade das tecnologias recomendadas e, assim determinam os critérios para efetuar o diagnóstico de doenças ou agravos à saúde, o tratamento (medicamentos, exames e demais terapias) e o acompanhamento dos pacientes (Ransoni *et al*, 2015; Ministério da Saúde, 2017; Ministério da Saúde, 2018b).

Assim, em 2013, o Ministério da Saúde atualizou o PCDT para efetuar o manejo da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em adultos, documento este que será referido no presente trabalho apenas como PCDT. Este protocolo estabeleceu, dentre outras determinações, os novos critérios para a realização dos exames de monitoramento imunológico e virológico dos pacientes infectados com HIV-1, respectivamente por meio da quantificação de Linfócitos T-CD4+ no sangue e quantificação de carga viral de HIV-1 no plasma (Ministério da Saúde, 2013a).

Na prática, o PCDT, que passou a ser aplicado efetivamente no início do ano de 2016, reduziu a frequência de realização do exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ em pacientes com ausência de sintomas, com última carga viral indetectável e história anterior de valores de linfócitos T-CD4+ superiores a 350 células/uL (Ministério da Saúde, 2018c).

## **2. PROPOSTA DO TRABALHO**

A proposta deste trabalho é de realizar a revisão da literatura e dos documentos oficiais, com o objetivo de entender o papel do exame laboratorial (quantificação de linfócitos T-CD4+) no monitoramento de indivíduos infectados com HIV-1, levando-se em consideração as recentes alterações realizadas no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em Adultos (PCDT). Este documento foi publicado em 2013 pelo Ministério da Saúde, e o impacto destas alterações na rotina do laboratório responsável pelo teste de quantificação de linfócitos T-CD4+ do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP.

### 3. HIV E A EPIDEMIA NO BRASIL E NO MUNDO

Os primeiros casos de AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* ou síndrome da imunodeficiência adquirida) no mundo foram descritos no início dos anos 80, nos Estados Unidos da América (EUA), Haiti e África Central, mas o agente etiológico, o vírus da imunodeficiência humana (HIV, *human immunodeficiency virus*) só foi isolado em 1983 no Instituto Pasteur em Paris, em pesquisa liderada pelo Dr. Luc Montagnier e no Instituto Nacional de Saúde (NIH - *National Institute of Health*) nos Estados Unidos da América (EUA), em pesquisa liderada pelo Dr. Robert Gallo (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983).

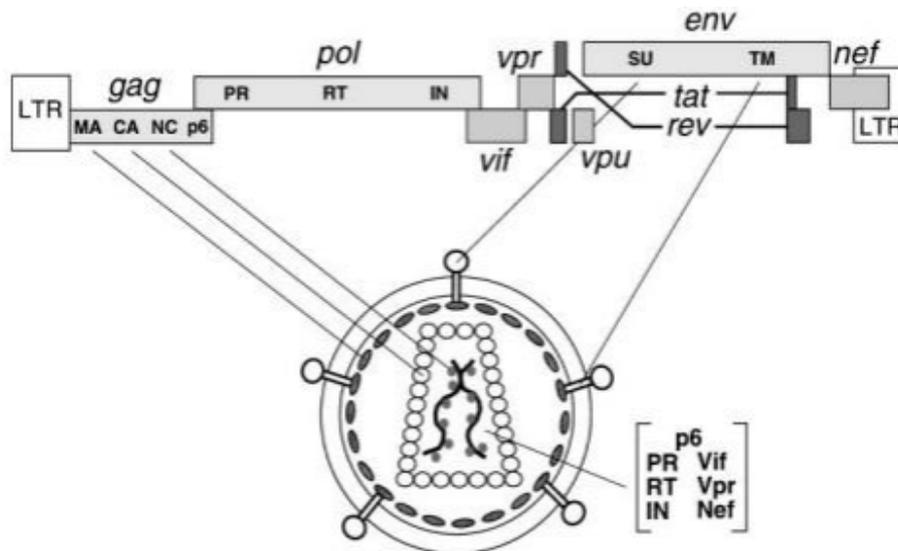
Em 1986, no Primeiro Encontro Nacional de AIDS, realizado em Canela, no Rio Grande do Sul, Caterino-de-Araújo e colaboradores do Instituto Adolfo Lutz apresentaram o trabalho referente à detecção de partículas virais esféricas com tamanho sugestivo de HIV em amostra de paciente, por meio de microscopia eletrônica. Esse mesmo achado foi confirmado um ano depois pelo Prof. Dr. Bernardo Galvão, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com o isolamento dessas partículas virais. (Teodorescu & Teixeira, 2015).

O HIV, inicialmente chamado de LAV ou HTLV-III, pertence à família *Retroviridae* e a subfamília *Lentiviridae*, que são vírus caracterizados por causarem infecções de progressão lenta e fatal. (Levinson & Jawetz, 2016).

De forma cilíndrica, o HIV mede aproximadamente 120 nm de diâmetro e é composto por duas fitas simples de RNA, que contém nove genes responsáveis pela codificação de polipeptídeos maduros. Estes derivam 15 proteínas clássicas estruturais e envolvidas na regulação da infecção e replicação viral, dentre as quais Env, Gag, Pol, Tat, Nef, Vif e Vpu, como demonstrado na FIGURA 1 (Draenert *et al.*, 2003; Gorse *et al.*, 2008; Priddy *et al.*, 2008). As fitas de RNA são envoltas por um capsídeo composto de várias proteínas p24, que por sua vez é coberta por uma camada de proteína p17, responsável pela manutenção da integridade viral. Externamente, o vírus é envolto por uma bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro, chamada de envelope viral. O envelope viral possui duas glicoproteínas importantes, gp120 e gp41, que participam da ligação e fusão do vírus a célula hospedeira. No interior do capsídeo, residem as três enzimas principais do

vírus envolvidas na fusão e replicação viral: protease, transcriptase reversa e integrase (Gelderblom *et al.*, 1988; Coffin, 1995).

**FIGURA 1:** Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.

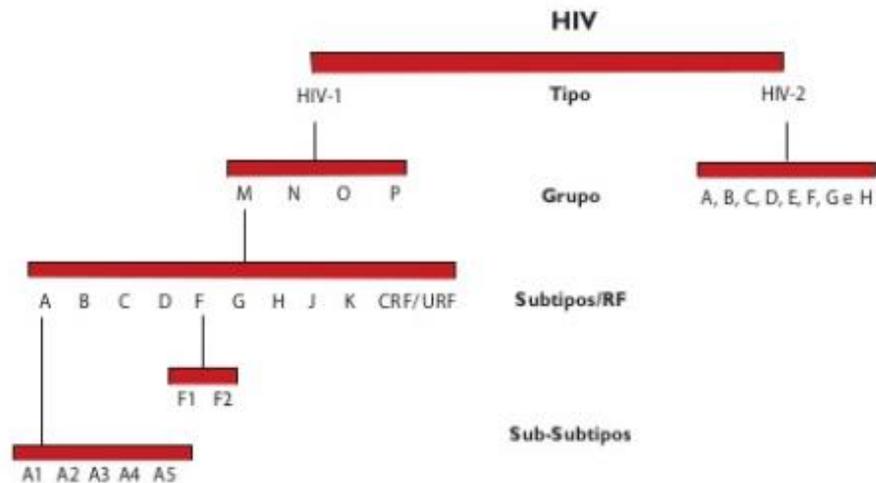


**Fonte:** Frankel & Young, 1998.

Existem dois tipos de HIV: (i) HIV-1, a forma mais virulenta e infecciosa, e responsável pela maioria das infecções observadas no mundo; (ii) HIV-2, a forma menos virulenta e de distribuição restrita na África Ocidental (Ministério da Saúde, 2018b).

O HIV-1 por sua vez é subdividido em quatro grupos: M (*major* / principal), N (*new* / não-M e não-O), O (*outlier* / divergente) e P (*putative*). O grupo M responsável pela epidemia de AIDS no mundo e é composto por vários subtipos nomeados de A a K. Além disso há as formas recombinantes circulantes (CRF- *circulant recombinant form*), como demonstrados na FIGURA 2 (Frankel & Young, 1998; Hahn *et al.*, 2000; Plantier *et al.*, 2009).

As formas recombinantes surgiram em função da alta taxa de multiplicação *in vivo*, como resultado de erros que podem ser cometidos por ação da enzima transcriptase reversa (RT) e pela incorporação, deleção ou substituição de nucleotídeos. Ademais, pela falta de mecanismos eficientes de reparo na etapa da retrotranscrição do genoma viral, ocasionam a produção de variantes mutantes (Plantier *et al.*, 2009; Vallari *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2014).

**FIGURA 2:** Representação da classificação do HIV

**Fonte:** Ministério da Saúde, 2013.

Enquanto os vírus do grupo M são amplamente distribuídos ao redor do mundo, o HIV-1 do grupo O é prevalente na África Central com alguns casos esporádicos na Europa e na América. O grupo N é restrito ao Centro-Oeste Africano (Thomson *et al.*, 2002) e, o grupo P foi isolado na República dos Camarões (Vallari *et al.*, 2010).

No Brasil, o subtipo B do HIV-1 é prevalente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, seguido pelo subtipo F1 e pelas formas recombinantes B/F1, enquanto que na região Sul, observa-se maior prevalência do subtipo C, com percentuais que variam de um Estado para outro (Ministério da Saúde, 2013a).

#### 4. INFECÇÃO PELO HIV-1 E A CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES INFECTADOS

A infecção das células pelo HIV-1 inicia-se com o processo de interação da molécula gp120 do envelope viral com a molécula CD4 presente na superfície das células do sistema imune do paciente, como macrófagos e linfócitos T-CD4+. A partir da ligação gp120-CD4, ocorre a alteração conformacional do envelope viral e da membrana celular, que levam à exposição da molécula gp41 do vírus, a qual se liga aos chamados co-receptores de HIV-1. Estes co-receptores, são moléculas presentes na superfície das células hospedeiras e que possuem o papel imunológico na embriogênese e são receptores de quimiocinas. As mais importantes moléculas

na infecção pelo HIV-, são as CCR5 e CXCR4, que desempenham papel importante na classificação viral, quanto ao seu tropismo. Os vírus que ligam à molécula CCR5 são denominados vírus R5-trópicos e, infectam monócitos, macrófagos e células dendríticas, nos quais estas moléculas estão presentes. Por outro lado, os vírus com tropismo para a molécula CXCR4, expressa em linfócitos T-CD4+, são denominados de vírus X4-trópicos. Os vírus capazes de se ligarem a ambos os co-receptores são denominados duo-trópicos ou R5X4-trópicos (Tortora *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2008; Deeks *et al.*, 2015).

Após a interação das gp120/gp41 do HIV com CD4 e co-receptores, com consequente alterações na membrana da célula e do vírus, ocorre a fusão das membranas e a introdução do capsídeo do HIV na célula. O material genético do vírus é liberado juntamente com as enzimas para sua replicação (Cunico *et al.*, 2008). Sob a ação da enzima transcriptase reversa ocorre a transcrição do RNA do vírus, transformando-o em DNA viral de dupla hélice, o qual é transportado para dentro do núcleo da célula. Nesta fase ocorrem as clivagens e integração ao DNA da célula do hospedeiro por meio de ação da enzima integrase. Uma vez que ocorra a ativação da célula hospedeira, há também a transcrição do DNA viral em RNA mensageiro. Este por sua vez é traduzido em proteínas virais, as quais sofrem maturação mediada pela ação da enzima protease. Esta enzima é responsável pela clivagem da poliproteína viral, precursora de proteínas individuais maduras. O RNA e as proteínas virais ficam agrupados na superfície celular como um novo *virion* e, então, são liberadas para infectar outras células (Janeway, 2002; Cunico *et al.*, 2008).

O vírus debilita gradualmente o hospedeiro induz a destruição do seu sistema imunológico, e afeta principalmente a função e o número de linfócitos T-CD4+. Esta célula é fundamental na construção de uma resposta imune adequada frente a algum distúrbio na homeostase, com consequente efeito negativo sobre a ativação de linfócitos T-CD8+ e linfócitos B. Desta forma, com a ausência de um sistema imune funcional, as infecções brandas podem prejudicar o hospedeiro e levá-lo a morte (Savi & Souza, 1999; Ministério da Saúde, 2017).

Além disso, o HIV-1 desencadeia alterações inflamatórias em todo o curso da infecção, desde a fase aguda com intensa replicação viral até a fase crônica com ocorrência de quadro clínico e laboratorial definidor da doença AIDS (Ministério da

Saúde, 2013a; Lewis *et al.*, 2014). As primeiras semanas da infecção pelo HIV-1 até o aparecimento dos anticorpos anti-HIV são as fases de soroconversão. Nesta fase, denominada fase aguda, bilhões de partículas virais são produzidas diariamente e a carga viral plasmática alcança níveis elevados, que tornam o indivíduo altamente infectante. Durante esta fase, ocorre considerável resposta inflamatória caracterizada pelo aparecimento de marcadores plasmáticos de fase aguda, como por exemplo: alfa-1 anti-tripsina e amiloide A. Há também liberação de uma grande quantidade de citocinas inflamatórias dentre as quais destacam-se o interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e a interleucina 15 (IL-15), coincidindo-se com o aumento expressivo da carga viral plasmática. O conjunto de manifestações clínicas, observado em 50 a 90% dos pacientes, é denominado de Síndrome Retroviral Aguda (SRA) (Ministério da Saúde, 2013a). Esta síndrome caracteriza-se pelos quadros clínicos como febre, adenopatia, faringite, exantema, mialgia e cefaléia; e pode ocorrer esplenomegalia, letargia, astenia, anorexia e depressão. Nesta fase é difícil efetuar o diagnóstico da infecção pelo HIV por meio de testes sorológicos. São também empregados exames moleculares para detecção do RNA ou DNA pró-viral (Ministério da Saúde, 2013f; Lewis *et al.*, 2014; Deeks *et al.*, 2015).

Com o avanço da infecção pelo HIV-1, os sintomas constitucionais como febre baixa, perda ponderal, sudorese noturna, fadiga, diarreia crônica, cefaléia, além de alterações neurológicas, infecções bacterianas (pneumonia, sinusite, bronquite), lesões orais, como a leucoplasia oral pilosa e, herpes zoster, tornam-se mais frequente. E todos esses quadros e sintomas são causados pela diminuição no número de linfócitos T-CD4+. Assim, o aparecimento de candidíase oral é pré-anúncio imunodepressão grave. A diarreia crônica e a febre de origem indeterminada, bem como leucoplasia oral pilosa, são prognósticos de evolução da infecção para AIDS (Pedersen *et al.*, 1989; Doitsh *et al.*, 2014).

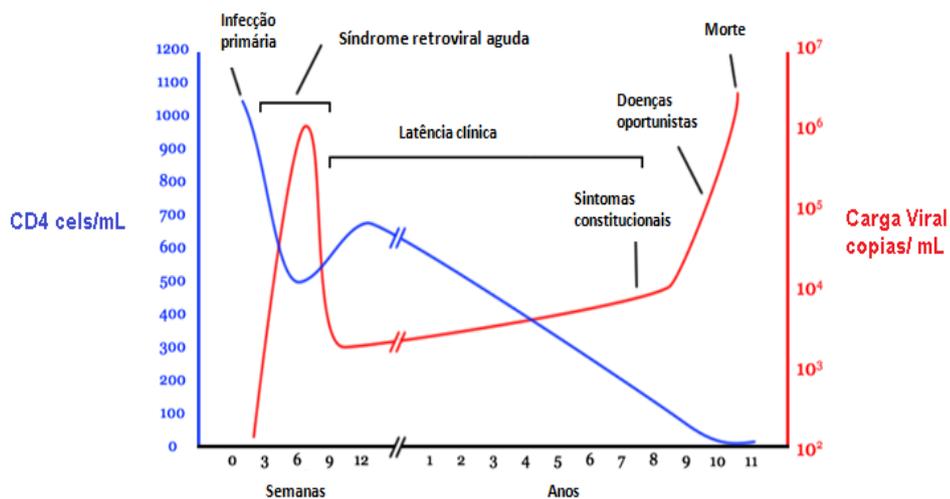
Na fase crônica da infecção, quando a contagem absoluta de linfócitos T-CD4+ pode ficar abaixo de 200 células/uL, aumentam as chances de aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias, que são definidores da AIDS. Entre as infecções oportunistas podem ser destacadas: pneumocistose, neurotoxoplasmose, tuberculose pulmonar atípica ou disseminada, meningite criptocócica e retinite causada por citomegalovírus. As neoplasias mais comuns são: Sarcoma de Kaposi,

linfoma não-Hodgkin; e as mulheres jovens, ocorre câncer do colo uterino (Pedersen *et al.*, 1989; Daar *et al.*, 2001; Ministério da Saúde, 2013a).

A ativação dos linfócitos T-CD4+ e linfócitos T-CD8+ é persistente na infecção pelo HIV-1 e está associada tanto à presença do vírus quanto aos outros fatores comuns em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), como por exemplo, a presença de agentes patogênicos que provocam estímulo constante, perda de linfócitos T-CD4+ e células regulatórias, fibrose do timo e da infraestrutura linfóide, etc. (Ministério da Saúde, 2013a).

Na fase de latência da infecção pelo HIV-1, as contagens de linfócitos T-CD4+ permanecem acima de 350 células/uL, e os episódios infecciosos oportunistas mais frequentes são na maioria das vezes de origem bacteriana. O HIV-1 pode persistir em células reservatórias e estabelecidas logo após a exposição ao vírus e, este fato é um grande obstáculo para o controle da doença (Lewis *et al.*, 2014; Deeks *et al.*, 2015).

**FIGURA 3:** História natural da infecção pelo HIV



Fonte: <http://www.infectologia.net.br/infeccao-pelo-hiv-3/>

A contagem de linfócitos T-CD4+ sempre foi de grande importância para realizar o monitoramento da progressão da infecção pelo HIV-1 nos pacientes. Este marcador laboratorial determina o estado imunológico dos indivíduos, e prediz a maior susceptibilidade às infecções oportunistas, os quais definem a AIDS, como demonstra a FIGURA 3 sobre a história natural da infecção pelo HIV-1. Diante disso,

o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC, *Center for Diseases Control*), em 1993, fez a revisão do sistema de classificação da infecção pelo HIV-1, levando-se em consideração a quantificação de linfócitos T-CD4+ associada à condição clínica de HIV. As alterações destacavam a importância da quantificação de linfócitos T-CD4+ nas amostras de sangue do indivíduo infectado, para efetuar o monitoramento da progressão da doença (CDC, 1993).

No Brasil, o primeiro caso de AIDS foi definido baseando-se em nos critérios publicados pelo CDC em 1982, ou seja, foi fundamentado em evidências laboratoriais indiretas e na presença de doenças indicativas de imunodeficiência. Com a devida adaptação, o Ministério da Saúde publicou o documento denominado Critério CDC modificado, levando-se em consideração as condições brasileiras que levou à exclusão de algumas doenças raras definidoras de AIDS no país e a tuberculose. E esta decisão foi feita pelo fato de haver considerável prevalência em indivíduos não portadores do HIV no Brasil (Ministério da Saúde, 1998; Ministério da Saúde, 2000).

Entre os critérios publicados pelo CDC e MS, na definição de AIDS, a diferença residia no ponto de corte na contagem de linfócitos T-CD4+. Enquanto o CDC estabelecia o corte em 200 células/uL, o MS definiu em 350 células/uL, justificada pelo estabelecimento de maior sensibilidade pretendido com o critério brasileiro. Desde então a definição de caso AIDS passou por diversas atualizações visando à adequação dos critérios, de acordo com as diversas sintomatologias associadas ao HIV e às condições diagnósticas laboratoriais (Ministério da Saúde, 1998; Ministério da Saúde, 2000).

Historicamente, vale a pena lembrar que o Brasil foi o primeiro país a implantar um programa com vista a desenvolver estudos sobre HIV/AIDS, assim como para garantir atendimento clínico, laboratorial, hospitalar, e apoio psíquico, mental e psiquiátrico, foi estabelecido em 1983, no Estado de São Paulo, pela iniciativa e ações tomadas pelo Dr. Paulo Roberto Teixeira. Neste contexto, a organização inicial e a sede do programa foram lotadas na Divisão de Hanseníase e Dermatologia Sanitária do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES/SP). E desde 1983, o Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e o Instituto Adolfo Lutz (IAL) fizeram parte como componentes deste Programa, para coordenar e implementar a retaguarda hospitalar e a realização de diagnósticos

laboratoriais de infecções por HIV e de AIDS e de infecções oportunistas, respectivamente (Teodorescut & Teixeira, 2015; Secretaria da Saúde, 2018).

O programa, hoje denominado Programa Estadual de IST/AIDS, tinha quatro objetivos principais: realizar vigilância epidemiológica, fornecer informações claras a população para evitar pânico e discriminação dos grupos (na época classificados como vulneráveis), garantir atendimento aos indivíduos verificados e orientar os profissionais de saúde. (Teodorescut & Teixeira, 2015).

Com o intuito de atender os indivíduos infectados residentes em todo o Brasil, de forma mais abrangente, em 1986 foi criado o Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (PN-DST/AIDS, atualmente Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente transmissíveis (IST), HIV/Aids e Hepatites Virais). Vale ressaltar que o Brasil foi um dos primeiros países em desenvolvimento a garantir o acesso universal e gratuito aos medicamentos antirretrovirais no Sistema Único de Saúde (SUS), a partir de 1996, com a criação da Lei 9.313 (União, 1996). Esta medida resultou na queda das taxas de mortalidade causada pela AIDS. Entretanto, apenas a distribuição dos medicamentos antirretrovirais não assegurava a garantia do tratamento, sendo necessário efetuar o monitoramento da resposta imunológica frente ao uso da medicação. (GIV, 2018).

Em 1988, foi criado o Centro de Referência e Treinamento em DST/ AIDS (CRT-AIDS), que tinha e tem como meta de ser a referência técnica, ser agente de capacitação e estabelecer normas técnicas, e descentralizar as atividades de prevenção, vigilância e assistência no Estado de São Paulo (Secretaria da Saúde, 2018). O Instituto Adolfo Lutz continuou realizando os trabalhos referentes à coordenação do componente Laboratório do Programa Estadual de DST/AIDS do Estado de São Paulo, que foram iniciadas em 1983.

Em 1995, com o objetivo de implementar a assistência aos indivíduos infectados com HIV-1 no Estado de São Paulo, foi implantada por meio de esforços e ações realizados em conjunto entre o Instituto Adolfo Lutz e o Programa Estadual de IST/AIDS, a rede de laboratórios executores de imunofenotipagem e quantificação de linfócitos T, por meio de Citometria de Fluxo. Posteriormente, esta Rede Estadual foi incorporada a Rede Nacional elaborada pelo Ministério da Saúde em 1997 (Ministério da Saúde, 2003). Logo a seguir houve a implantação da Rede

Estadual de Carga Viral, seguindo-se as estratégias e planejamentos da Rede acima citada.

Atualmente, há a Rede Nacional de Laboratórios de CD4/CD8, como é conhecida a rede de laboratórios que executam o ensaio de quantificação de linfócitos T-CD4+ no sangue periférico, utilizando-se a metodologia de Citometria de Fluxo. Esta rede é gerenciada pelo Ministério da Saúde em parceria com os Programas Estaduais de cada Estado, bem como a rede de laboratórios de quantificação de carga viral de HIV-1 no plasma e a Hepatites Virais (Ministério da Saúde, 2003). Em consonância com a classificação clínico-laboratorial dos indivíduos infectados com HIV-1 definidos pelo CDC e também pelo Ministério da Saúde do Brasil (Ministério da Saúde, 1998), os testes de quantificação de linfócitos T-CD4+ e de carga viral, permitem monitorar a evolução clínica dos indivíduos infectados pelo HIV-1, determinam e avaliam a eficácia do tratamento antirretroviral e definem as adoções de terapias preventivas a infecções oportunistas (Ministério da Saúde, 2013a).

A disponibilidade dos exames de quantificação de linfócitos T-CD4+ e carga viral plasmática auxiliavam no monitoramento da infecção pelo HIV-1. No entanto, começaram a observar alguns casos de indivíduos infectados com HIV-1 e tratados que não respondiam adequadamente ao esquema terapêutico. Neste contexto, houve a necessidade de estabelecer o monitoramento da resistência viral por meio de teste de genotipagem. Desta forma, a Rede de Laboratórios de Genotipagem (RENAGENO) foi estabelecida em 2002, com o objetivo de estudar o padrão genético das cepas circulantes do HIV, e avaliar a prevalência e circulação das cepas de HIV-1 resistentes em indivíduos de diferentes regiões no Brasil que ainda não haviam iniciado o tratamento. Ao mesmo tempo foi caracterizado o evento de resistência fenotípica de HIV-1, determinando-se a presença de mutações associadas à exposição prévia aos medicamentos e esquemas terapêuticos. Este estudo colaborou no melhor atendimento dos indivíduos infectados pelo vírus HIV (Ministério da Saúde, 2005; Dourado, Veras, Barreira, 2006).

Mesmo com todos esses esforços a AIDS continuou e continua sendo um grave problema de saúde pública, com 42.420 novos casos de infecção por HIV e 37.791 pacientes com AIDS registrados em 2017. Ao redor de 50% dos casos

residentes na região Sudeste do país apresentam proporção média entre homens e mulheres de 2 para 1, respectivamente (Ministério da Saúde, 2018b).

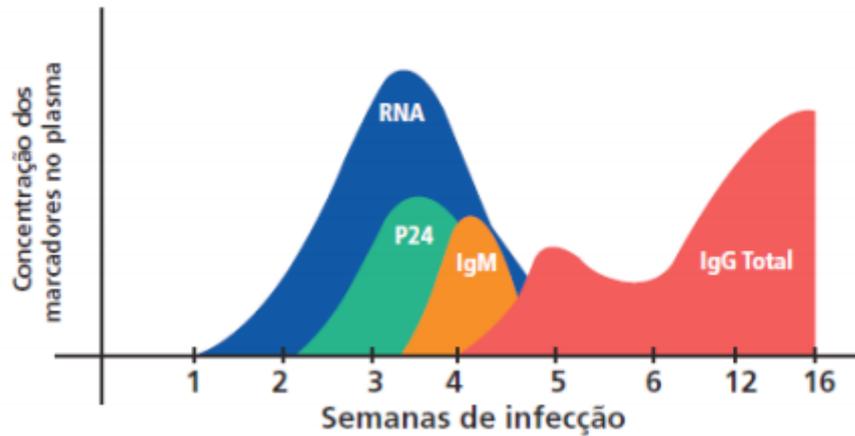
## **5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV**

Logo após a descoberta do agente etiológico da AIDS, pesquisadores começaram a averiguar uma forma de diagnosticar laboratorialmente a infecção pelo HIV. Os testes iniciais baseados na técnica de imunofluorescência direta e/ou indireta, foram logo substituídos pelos testes imunoenzimáticos (ELISAs), que foram comercialmente disponíveis em 1985 (Ministério da Saúde 2018c). Dois anos depois, o teste de Western Blot foi desenvolvido e aprovado para ser utilizado no diagnóstico de infecção por HIV. Atualmente, os testes são muito para realizar o diagnóstico da infecção pelo HIV, baseados em técnicas manuais, semiautomatizadas e automatizados, e baseados na reação antígeno-anticorpo, utilizando-se diversas e diferentes modalidades de técnicas diagnósticas e diversidade de antígenos.

Em 2013, foi publicada a Portaria nº 29 de 17 de dezembro, que aprovou o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV. Esta portaria apresenta algoritmos de ensaios laboratoriais que possibilitam a execução de diagnóstico seguro da infecção pelo HIV, incluindo-se a utilização de testes rápidos (TR), que possibilita efetuar o diagnóstico em ambientes laboratoriais e não laboratoriais, e amplia o acesso dos interessados ao diagnóstico laboratorial (Ministério da Saúde, 2018c).

Além dos testes rápidos, os marcadores moleculares e antigênicos podem ser empregados para auxiliar o diagnóstico laboratorial, de acordo com a fase da infecção, como demonstrado na FIGURA 4.

**FIGURA 4:** Marcadores virais e imunológicos de acordo com o período de infecção.



Fonte: Ministério da Saúde, 2018c.

A disponibilidade de testes laboratoriais tem grande importância não somente para realizar e confirmar o diagnóstico clínico, mas também para efetuar a triagem sorológica de doadores de sangue, de hemoderivados e de órgãos para transplante, assim como para conduzir estudos de vigilância epidemiológica (Buttò *et al.*, 2010). Estes testes são classificados conforme o propósito: seja para triagem diagnóstica, seja como testes complementares ou como testes de confirmação.

### 5.1 Testes de triagem

Utilizados como primeira fase do diagnóstico laboratorial, os testes utilizados na triagem de alta sensibilidade, e que têm sendo aperfeiçoados ao longo do tempo, com o intuito de reduzir os resultados falso-positivos e falsos negativos. (Constantine, 2016).

Os primeiros testes de ELISA, chamados de primeira geração, baseavam-se na detecção indireta de anticorpos específicos anti-HIV-1 presentes na amostra de plasma ou de soro em avaliação. Os anticorpos eram “capturados” pelos antígenos, que são obtidos da lise do HIV proveniente de cultura celular, e que estão “fixos” em superfície sólida. O complexo antígeno-anticorpo é revelado com o auxílio de um conjugado, composto por anticorpo anti-IgG humana marcado com substância enzimática (Alexander, 2016). Estes testes apresentavam limitação quanto à classe de imunoglobulina dos anticorpos detectados, classe IgG, e

impunham uma alta janela de soroconversão, que variava em média de 35 a 45 dias após a infecção (Ministério da Saúde, 2018c)

A segunda geração de ELISA passa a utilizar antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados das proteínas do HIV como antígeno de captura. Esta modalidade de ensaio tornam-se comparativamente mais sensíveis e específicos, e houve redução da janela de soroconversão para 25 a 36 dias em média (Owen, 2012; Bartlett, 2017).

A terceira geração de ELISA passa do método indireto para o método “sanduíche”, que tem como princípio a utilização de antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos, fixados na fase sólida ou conjugados a uma enzima. Esses ensaios destacam anticorpos específicos contra HIV tanto da classe IgG quanto da classe IgM (Owen, 2012; Ministério da Saúde, 2018c).

Os testes de quarta geração destacam não somente os anticorpos anti-HIV, mas também, de forma simultânea, a presença de antígeno p24do HIV. E esta modalidade de ensaio reduz ainda mais a janela de soroconversão, como demonstra a FIGURA 4. (Ministério da Saúde, 2018c).

Outro grupo de testes utilizados na triagem sorológica com objetivo diagnóstico são os chamados testes rápidos (TR), que apresentam resultados em até 30 minutos. Com as características de sensibilidade e especificidade equivalente aos de ELISAs, os TR foram desenvolvidos para serem utilizados em ambientes não laboratoriais e para analisar amostras de sangue obtidas por meio de punção digital ou amostras de fluido oral.

Existem vários formatos de TR, sendo os mais utilizados: os dispositivos (ou tiras) de imunocromatografia de fluxo lateral, imunocromatografia de duplo percurso (DPP) e imunoconcentração (Buttò *et al.*, 2010; Owen, 2012). Os “auto-testes” disponíveis comercialmente em farmácias, por exemplo, também são testes rápidos, e podem ser realizados pelo próprio indivíduo (Ministério da Saúde, 2018c).

## **5.2 Testes confirmatórios e/ou complementares**

Pertencem a esta categoria de testes confirmatórios, os testes de Western blot (WB), de imunoblot (IB) e imunoensaios em linha (LIA, Line immunoassay), bem

como o imunoblot rápido (IBR) e os testes de imunofluorescência indireta (IFI) (Iweala, 2004; Buttò *et al.*, 2010; Yerly & Hirschell, 2012).

Como o próprio nome diz os testes confirmatórios para a infecção pelo HIV retificam os resultados de reatividade positiva ou negativa das amostras contra os antígenos específicos obtidos nos testes de triagem.

Os testes de Western blot (WB) utilizam como fase sólida uma tira de membrana de nitrocelulose como fase sólida, em que estão fixadas as proteínas fracionadas do HIV, as quais distribuídas de acordo com os seus pesos moleculares. A reação entre o antígeno adsorvido à membrana de nitrocelulose e os anticorpos da amostra é revelada pelo processo enzimático. Resumidamente, a membrana de nitrocelulose é incubada com as amostras de soro ou plasma, e os anticorpos presentes se ligam às proteínas do HIV contidas na membrana. A detecção do complexo antígeno-anticorpo é realizada com auxílio de anticorpos secundários conjugados com uma enzima. A reação é revelada adicionando-se o substrato específico que se degrada tornando-se um produto corado, e a visualização da reação sobre a fita é feita a olho nu (Buttò *et al.*, 2010). As amostras são consideradas positivas e confirmadas, quando apresentam reatividade contra pelo menos duas frações de uma das seguintes proteínas do HIV: p24, gp41, gp120 e gp160.

O princípio do teste de imunoblot (IB) é semelhante ao do Western blot, porém ao invés de proteínas fracionadas do HIV, são utilizadas as proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos. (Iweala, 2004; Buttò *et al.*, 2010).

Tanto os testes de triagem, quanto os testes confirmatórios, garantem a detecção de pelo menos 95% dos casos de infecção pelo HIV em fase crônica, quando a produção de anticorpos já atingiu seu pico. Para o diagnóstico de infecções agudas e/ou recentes, os testes moleculares baseados na detecção de RNA ou DNA proviral são mais adequados, assim como para o diagnóstico de infecção em crianças nascidas de mães soropositivas (Mcmichael *et al.*, 2010).

## **6. MONITORAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV**

Após a confirmação da infecção pelo HIV, o paciente é acolhido no serviço de acompanhamento ambulatorial, e torna-se necessário realizar o seu monitoramento

imunológico e virológico, por meio de testes de quantificação dos linfócitos T-CD4+ e de carga viral plasmática de HIV-1, respectivamente.

A contagem de linfócitos T-CD4+ é o parâmetro laboratorial preditivo do prognóstico da infecção pelo HIV, e é também indicador de risco de ocorrência de infecções oportunistas, principalmente em pacientes sintomáticos. Este teste é utilizado para definir se há necessidade de realizar a quimioprofilaxia para doenças oportunistas, como a pneumocistose e a neurotoxoplasmose. Os valores de contagem de linfócitos T-CD4+ auxiliam na verificação da efetividade da terapia antirretroviral, uma vez que a sua contagem de células TCD4+ tem uma boa correlação com a resposta do indivíduo ao tratamento (Moore *et al.*, 2009).

Por outro lado, a quantificação de carga viral de HIV-1 no plasma monitora a resposta frente ao tratamento, cujo objetivo é de reduzir a viremia até ao nível indetectável. A não redução da carga viral ou mesmo o aumento, são indicativos de uma progressão da doença e/ou ineficácia do tratamento (Bento, 2016).

Com o objetivo de implementar o atendimento aos pacientes infectados pelo HIV-1 na rede pública, foram estruturadas duas redes de realização de exames, a rede de laboratórios para contagem de linfócitos T-CD4+ e a rede de laboratórios para quantificação de carga viral plasmática de HIV-1, inicialmente no Estado de São Paulo, em uma parceria do Programa Estadual de IST/Aids com o Instituto Adolfo Lutz e apoio financeiro do Banco Mundial, e posteriormente a nível nacional.

### **6.1 Rede Nacional de Laboratórios para contagem de linfócitos T-CD4+**

A Rede Nacional de Laboratórios para contagem de Linfócitos T-CD4+, constituída atualmente por 92 laboratórios, realiza os testes de quantificação de linfócitos T-CD4+ e linfócitos T-CD8+, por meio de Citometria de Fluxo, para efetuar o monitoramento da evolução clínica de indivíduos infectados pelo HIV, quando da introdução da terapia com antirretrovirais para novos pacientes. Este monitoramento possibilita a adoção de terapias preventivas contra infecções oportunistas e busca a efetividade do tratamento. (Ministério da Saúde, 2018d).

**FIGURA 5:** Cartograma da Rede Nacional de Laboratórios CD4+/CD8+.



Fonte: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISA5935B3CPTBRIE.htm>

Graças ao advento da Citometria de Fluxo, a quantificação de linfócitos T-CD4+ pode ser ofertado em larga escala, pois os métodos manuais anteriores empregados eram limitantes quanto à capacidade analítica.

#### 6.1.1 Técnicas para quantificação de Linfócitos T-CD4+

##### 6.1.1.1 Imunofluorescência

A quantificação de linfócitos T-CD4+ por meio desta metodologia requer o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*). Para tanto, centrifuga-se o sangue diluído sobre o gradiente de densidade utilizando soluções compostas por polissacarídeos e substâncias de alta densidade. Estes reagentes fracionam os elementos do sangue periférico em camadas. As PBMC formam um "anel branco" que é removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Esta separação também pode ser realizada com a utilização de *fluorobeads*, que são partículas magnéticas em que estão acoplados os anticorpos monoclonais específicos (Arosa *et al.*, 2012).

Após a separação das PBMC, o teste de imunofluorescência direta é realizado utilizando-se conjugados de anticorpos policlonal marcado com fluorocromos (Aoki *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2013)

#### 6.1.1.2 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica localiza os sítios antigênicos de interesse em células de fluidos corpóreos de aspirados celulares e de *imprint*. Esta técnica pode ser empregada de forma direta ou indireta. A forma direta utiliza um anticorpo marcado que reage diretamente com o antígeno presente na amostra; e a forma indireta emprega dois anticorpos, sendo um anticorpo primário não marcado, por exemplo, anti-CD4 ou anti-CD8, que reage com o antígeno presente no tecido. Um anticorpo secundário marcado reage com o anticorpo primário. A visualização do complexo formado é realizada em microscópio óptico (Moraes, 2008).

#### 6.1.1.3 Separação magnética

Esta técnica consiste na utilização de partículas magnéticas conjugadas com anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície de interesse (ex. CD4, CD8), que após a incubação para efetuar a ligação do anticorpo com o antígeno específico, o conjunto é submetido a uma coluna magnética que irá reter as células ligadas às partículas magnéticas, enquanto que as demais células serão desprezadas (Matos, 2016).

#### 6.1.1.4 Citometria de Fluxo

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a realização de teste de quantificação de células T-CD3/CD4/CD8 para pacientes infectados pelo HIV, utilizando-se o método de Citometria de fluxo, em função de sua alta precisão e reprodutibilidade (Neves Jr & Morgado, 2000).

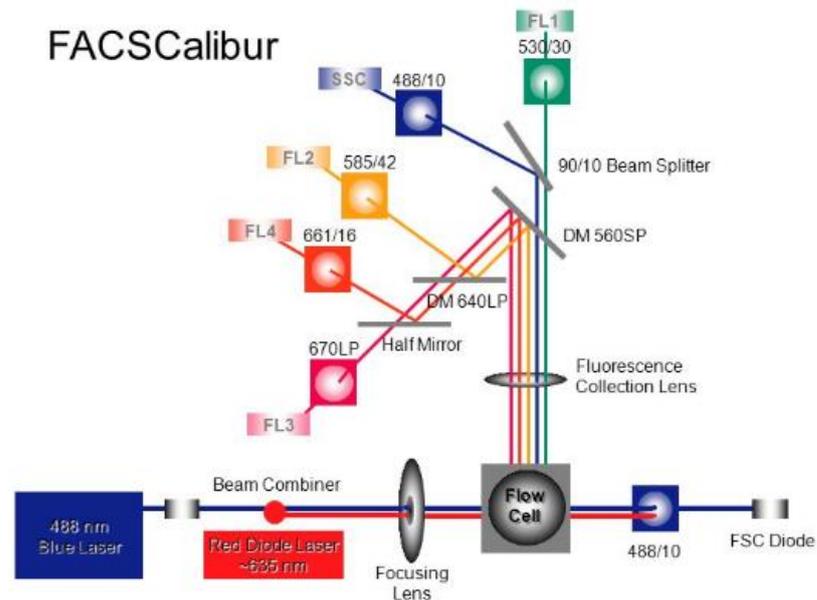
A citometria de fluxo é uma tecnologia avançada para realizar análise simultânea e multiparamétrica de células ou partículas em suspensão, as quais são analisadas individualmente à medida que elas passam por um feixe de luz (laser). Uma vez que as células estão em suspensão, a contagem de milhares delas é possível em curto período de tempo (Russo, 2010).

A ideia inicial do que viria a ser Citômetro de Fluxo foi concebido na década de 30, mas somente no final da década de 40, com os princípios de impedância elétrica e focalização hidrodinâmica de Wallace Henry Coulter, é que surgiram os primeiros instrumentos contadores hematológicos. Com a conjugação de anticorpos aos fluorocromos, que são substâncias capazes de emitir fluorescência quando excitados por luz de determinado comprimento de ondas, a citometria de fluxo

passou a ser utilizada para executar a separação de populações celulares, em um processo conhecido como “sorting” (na língua portuguesa poderia traduzir como classificação ou organização) (Silva *et al*, 2016).

Neste método, as células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos, os quais estão conjugados aos fluorocromos excitáveis ao raio laser. A seguir, estas células são introduzidas em uma câmara vibratória, onde são envolvidas por uma solução tampão. A pressão produzida pelo equipamento faz com que as células fiquem em “fila”, de tal maneira que ocorra a interceptação individual do raio laser em cada célula. Quando a luz incidente na partícula é dispersa em ângulos pequenos atingindo o detector fotodiodo posicionado frontalmente ao laser, chamado de *Forward Scatter* (FSC, dispersor de luz anterior), ocorre a geração de valores correspondentes ao tamanho da célula. Quando a mesma luz é dispersa lateralmente em ângulos maiores, e atinge o detector *Side Scatter* (SSC, ângulo de 90°), ocorre a geração de valores correspondentes à granulosidade ou à complexidade interna da célula. Quando os anticorpos conjugados aos fluorocromos são utilizados, estes absorvem a energia do laser, que por sua vez é liberada pelo fluorocromo por meio de vibração, dissipação de calor e emissão de fótons de comprimento de onda maior que a do laser. A luz dispersa correspondente à fluorescência é coletada por filtros, espelhos e lentes que vão direcioná-las para os detectores específicos. Uma vez que os sinais luminosos são capturados, estes são convertidos em sinais eletrônicos para assim serem analisados em um *software*. No *software* os dados são “plotados” em gráficos de histogramas e/ou “dot plot”, que realizam a análise de um único parâmetro ou então dois, respectivamente (Gridem, 1996; Roitt *et al.*, 1999; Givan, 2001).

**FIGURA 6:** Sistema Óptico do Citometro de Fluxo.



Fonte: Google imagens, acesso em 23/nov/2018.

Vale dizer que a Rede Nacional de Laboratórios de contagem de CD4/CD8 realiza os ensaios utilizando *kits* com tubos Trucount para a quantificação absoluta direta de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> (BD, San Jose, EUA) desde 1995 até os dias de hoje. Houve alteração apenas do tipo de reagente Tritest<sup>TM</sup> contendo três marcadores (CD3, CD4 e CD8) para Multitest<sup>TM</sup>, contendo quatro marcadores (CD45, CD3, CD4 e CD8), e troca dos equipamentos simples por outros mais sofisticados que possibilitam executar análise aberta dos dados. (Silva, 2009).

## 6.2 Rede Nacional de Laboratórios para quantificação de carga viral de HIV

A Rede Nacional de Laboratórios para quantificação de carga viral de HIV é constituída por 84 laboratórios distribuídos em todo o país. Estes laboratórios realizam testes para quantificar a carga de vírus circulante, presente em amostra de sangue dos pacientes. Esses testes visam monitorar a efetividade do tratamento de um indivíduo HIV positivo.

## 6.2.1 Técnica para quantificação de carga viral

### 6.2.1.1 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Oriunda do inglês, a técnica *Polymerase chain reaction quantitative real time*, a qPCR, realiza a quantificação do material genético de interesse amplificado de forma precisa, e com alta reprodutibilidade, por determinar valores, que ocorrem durante a fase exponencial da reação. O ponto em que se detecta no ciclo, o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (CT), baseado em um produto fluorescente, e a quantificação da fluorescência é proporcional ao DNA amplificado. Esta metodologia combina a amplificação e a detecção simultaneamente, isto é, a fluorescência emitida é mensurada em tempo real à medida que os produtos são originados no decorrer da reação. O teste conta com o Termociclador com sistema ótico para efetuar a excitação da fluorescência, e um computador com *software* para realizar a aquisição dos dados e a análise final da reação (Novais & Alves, 2004).

### 6.2.1.2 Abbott™ Real time

Este teste *in vitro* consiste em ensaio de reação em cadeia de polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) e de transcrição reversa (RT-PCR), por meio de detecção de fluorescência em tempo real para quantificar o vírus HIV-1 presente no plasma de indivíduos infectados. Este procedimento gera o produto amplificado, a partir do genoma de RNA do HIV-1 presente em amostras clínicas de pacientes infectados (Ladeira, 2011).

De forma resumida, neste procedimento laboratorial são empregados dois equipamentos: o Abbott *m2000sp*, em que ocorre a extração do RNA do vírus e a adição da mistura principal, para preparar a amostra para efetuar a retrotranscrição e a amplificação, que são realizadas no equipamento Abbott *m2000rt*. O sinal fluorescente detectado no ciclo é proporcional à concentração de RNA do HIV-1 presente na amostra em análise. Os resultados finais do ensaio são fornecidos em escala log e em número de cópias/mL (Novais & Alves 2004; Abbott, 2013).

O exame de quantificação de carga viral de HIV-1 no plasma foi sempre executado de forma pareada com o exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ até final do ano de 2015, quando novos critérios de solicitação de exames foram apresentados no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, para o manejo da

infecção pelo HIV-1 em pacientes adultos, publicado pelo Ministério da Saúde em 2013 e mencionado mais adiante neste trabalho.

### **6.3 Rede de Laboratórios de genotipagem - RENAGENO**

Em 2002, em função de uma demanda inicialmente de origem judicial, e pela disponibilidade de medicamentos da classe antagonista de CCR5, foi estabelecida a Rede Nacional de Laboratórios executores de genotipagem do HIV-1. A finalidade desta Rede foi de caracterizar o genótipo do HIV predominante no paciente infectado, e de detectar a resistência genotípica do vírus isolado. A presença de mutações do HIV esta associada à possível resistência do vírus aos medicamentos em uso pelos pacientes em tratamento com terapia antirretroviral. Este fato pode ocorrer em pacientes atendidos na rede pública, que não tenham apresentado melhora clínica e imunológica ou tenha tido piora clínica após determinado período de tratamento. Houve, então, a possibilidade de adequar os medicamentos utilizados na terapia antirretroviral e de selecionar a terapia de resgate (Ministério da Saúde, 2013).

Além disso, o estabelecimento desta rede possibilitou estimar, nas diferentes áreas geográficas, os subtipos circulantes, a prevalência de mutações, bem como sua associação com a gravidade da doença, sua exposição prévia aos medicamentos e ao esquema terapêutico em uso no momento da coleta da(s) amostras(s) (Ministério da Saúde, 2013b).

Em 2015, em busca de estratégias para proporcionar maior agilidade à realização dos exames de genotipagem do HIV-1, e sanar as dificuldades de aquisição dos reagentes para execução de análises laboratoriais, foi determinada a centralização da realização destes exames. Neste contexto, a RENAGENO centralizou a realização de seus testes em um laboratório terceirizado (Ministério da Saúde, 2018e).

O ensaio de genotipagem executa a amplificação das regiões de polimerase, integrase e envelope do HIV, para analisar e avaliar a susceptibilidade aos medicamentos antirretrovirais. Estas drogas já existentes ou sintetizadas na década de 80 foram testadas e empregadas com a finalidade de impedir a multiplicação do vírus no organismo infectado. Atualmente, já contam com 22 medicamentos, que

podem ser divididos em seis grupos, classificados de acordo com o local de sua ação e finalidade, são eles: inibidores da Transcriptase reversa nucleosídeos e não nucleosídeos, inibidores da Protease, inibidores de fusão, inibidores da Integrase e inibidores de entrada. (GIV, 2018).

### 6.3.1 Técnicas Aplicadas para Genotipagem do HIV-1

#### 6.3.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Esta técnica foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis. A PCR consiste em realizar a amplificação *in vitro* de um segmento específico de DNA dentro de um genoma, até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta, e que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. Para que ocorra a PCR é necessário um DNA molde (DNA de interesse). Os *primers* (iniciadores) são um pequeno fragmento de DNA de fita simples que se ligam ao DNA molde, e que atuam como um "iniciador" para a enzima polimerase. Os dNTP's (desoxirribonucleotídeos) são incorporados à fita de DNA no momento de sua extensão. Este processo é realizado pela DNA- polimerase (Taq), na presença de solução tamponada e magnésio (Mg<sup>++</sup>), que participam na estabilização da enzima. Este processo ocorre em etapas: a) denaturação das cadeias do DNA genômico; b) anelamento (*annealing*) dos *primers* usados para delimitar a seqüência a ser amplificada; c) emprego de temperatura específica para a ação da enzima (72°C); d) reinício do ciclo. A revelação do produto amplificado é feita por meio de eletroforese em gel de agarose, em que os fragmentos são separados em bandas, de acordo com o peso molecular (Novais & Alves, 2004; Bustin, et al., 2009).

#### 6.3.1.2 Sequenciamento de Sanger

Sequenciamento de DNA é o processo de determinação da seqüência de nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) em um pedaço de DNA. No método Sanger de sequenciamento, o DNA alvo é copiado diversas vezes, produzindo-se fragmentos de comprimentos diferentes, ao final dos quais são incorporados os nucleotídeos "terminadores de cadeia" fluorescentes, que possibilita efetuar a determinação da seqüência (Reece, et al., 2011; Thermo Fisher Scientific, 2016).

### 6.3.1.3 Bioinformática

As ferramentas de Bioinformática são essenciais para analisar os dados gerados após o sequenciamento, e possibilitam a realização de diferentes análises, e fazer a ligação do experimento biológico com os dados gerados, por meio do arquivo gerado pelo sequenciador. O equipamento gera um arquivo e, este é submetido às plataformas virtuais e aos programas para a sua análise. É necessário realizar a análise e a edição da sequência genética. No caso do HIV, pode-se verificar a suscetibilidade e a resistência aos medicamentos, além de estabelecer o seu subtipo e o tropismo do vírus. Estes dados geram um laudo para o médico, e que após sua análise, pode-se determinar a terapia de resgate adequada (Borges, 2015).

### 6.4 PCDT para manejo da infecção pelo HIV-1 em adultos

Os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) são documentos oficiais do Ministério da Saúde (MS), que vêm sendo elaborados desde o final da década de 70, com a participação de hospitais, sociedades médicas e sistemas públicos de saúde. Estes documentos e que visam a garantia de melhor cuidado à saúde do paciente ou do usuário do Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da determinação de critérios para realizar o diagnóstico da doença ou do agravamento à saúde, o tratamento (medicamentos, exames e demais terapias) e, o acompanhamento dos pacientes. Baseados em evidências científicas, os PCDTs levam em consideração a eficácia, a segurança e o custo-efetividade das tecnologias recomendadas (Ransoni *et al.*, 2015; Ministério da Saúde, 2018f).

Em 2013, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil atualizou o PCDT para o manejo da infecção pelo HIV em adultos, que foi aplicado efetivamente no início do ano de 2016. A nova recomendação leva-se em consideração a condição clínica, o histórico da contagem de linfócitos T-CD4+ e a última quantificação de carga viral plasmática de HIV-1, com o objetivo de estabelecer o uso racional do exame de quantificação de linfócitos T-CD4+. Estas medidas reforçam que, em pacientes estáveis, em uso de terapia antirretroviral (TARV) e com carga viral indetectável, o foco do monitoramento laboratorial deve ser feito por meio de detecção precoce de falha virológica e pelo acompanhamento da quantificação de carga viral. As novas recomendações foram baseadas em evidências científicas e amplamente discutidas

pelo Comitê Assessor para Terapia Antirretroviral em Adultos infectados pelo HIV do MS.

O PCDT atualizado prevê que o exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ não deve ser utilizado para realizar o monitoramento clínico de indivíduos infectados pelo HIV, quando todas as seguintes condições estiverem presentes no paciente: ser assintomático, estar em tratamento antirretroviral (TARV), apresentar carga viral indetectável e, ter apresentado em dois exames consecutivos (com intervalo mínimo de seis meses de um para o outro) a contagem de linfócitos T-CD4+ igual ou superior a 350 células/uL, como demonstra a TABELA 1.

**TABELA 1:** Avaliação clínica para solicitação de contagem de linfócitos TCD4.

<b>PVHIV com as seguintes condições</b>	<b>Valor de CD4<sup>(1)</sup></b>	<b>Frequência de Solicitação</b>
- Em uso de TARV - Assintomático - Com carga viral indetectável	CD4 < 350 células/uL	A cada 6 meses.
- Em uso de TARV - Assintomático - Com carga viral indetectável	CD4 > 350 células/uL	Não solicitar.
- Sem uso de TARV - Com evento clínico - Em falha virológica	Qualquer valor de CD4	A cada 6 meses

**Fonte:** Ministério da Saúde, 2017g. PVHIV= pacientes vivendo com HIV. (1) Considerando os últimos exames consecutivos, com intervalo mínimo de 6 meses entre eles.

A nova recomendação não prediz o fim da realização dos exames de quantificação de linfócitos T-CD4+, mas sim reitera sua importância crucial no monitoramento clínico e laboratorial de pessoas vivendo com HIV/AIDS (Ministério da Saúde, 2018d).

## **7. DISCUSSÃO**

O monitoramento de indivíduos infectados por HIV-1 por meio da realização do teste de quantificação de linfócitos T-CD4+ constitui instrumento importante para avaliar o estado da resposta imunológica do paciente.

Os primeiros critérios de classificação da infecção pelo HIV-1, estabelecidos pelo CDC e pelo MS, levavam em consideração a contagem de linfócitos T-CD4+, e esses valores eram utilizados como guia para introdução de medicamentos antirretrovirais. Assim, a terapia antirretroviral era introduzida quando eram observados os sinais de uma sintomatologia avançada ou de imunodeficiência acentuada (contagem de linfócitos T-CD4+ igual ou inferior a 200 células/uL), evitando a exposição precoce à toxicidade das drogas e seus efeitos colaterais (Ministério da Saúde, 2002o). Desta forma, no início das atividades da Rede de laboratórios de CD4/CD8 e, posteriormente, também da Rede de carga viral, a realização dos exames a cada 3 ou 4 meses foi prevista, justamente para determinar o melhor e adequado momento para introduzir a terapia antiretroviral.

Atualmente, com o avanço dos medicamentos antirretrovirais, com menos efeitos colaterais e menor toxicidade, associado a diversos estudos que sugerem a introdução precoce de terapia antirretroviral, contribuem na preservação do sistema imunológico e no aumento da expectativa de vida do indivíduo. Isto ocorre porque preserva melhor a capacidade de recuperação da resposta imune, e o papel da contagem de linfócitos T-CD4+ passou a ser avaliado. De fato, observando-se a rotina do laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto Adolfo Lutz, menos de 20% das amostras a serem analisadas apresentam alteração nos resultados da contagem de linfócitos T-CD4+ entre dois exames realizados, com diferença de tempo de até 4 meses como acontecia inicialmente. Estes achados corroboram a observação de alguns autores, que afirmam que o exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ não traz benefício ao monitoramento clínico-laboratorial. Em pacientes estáveis e em tratamento, assintomáticos e com carga viral indetectável, as flutuações laboratoriais e fisiológicas não têm relevância clínica. Nesta situação basta efetuar o monitoramento utilizando-se o exame de quantificação de carga viral (Rawizza et al. 2011; Maggioli; Leone 2010; Ministério da Saúde, 2013a).

Comparando-se as rotinas realizadas no laboratórios de Citometria de Fluxo do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo nos anos de 2013 e 2017, verifica-se que a implantação do PCDT reduziu o número total de exames total em torno de 50%. Este fato significa que houve uma economia aproximada de R\$ 140 mil reais somente com o laboratório do IAL, considerando-se que eram realizados em média 10 mil exames por ano, ao custo médio de R\$ 28,00 reais por exame. Apesar desta

redução no número de exames, observa-se que o impacto entre os pacientes atendidos foi apenas entre aqueles que não “necessitam” da realização do exame com grande frequência. A classificação dos pacientes quanto à idade ou quanto ao gênero não foi afetada, havendo diminuição apenas no número de exames que cada paciente realizava por ano.

Além disso, vale ressaltar que o Brasil passou a adotar o mesmo procedimento terapêutico dos Estados Unidos e da Europa, bem como no que se refere à frequência de realização do exame da quantificação de linfócitos T-CD4+. Ocorre apenas uma diferença, que ao contrário do Brasil, nesses dois blocos de países, a realização do exame é opcional ou é feita a cada 12 meses. Pois, assim como nós do laboratório de Citometria de Fluxo do IAL, entendemos que o monitoramento do estado imunológico do paciente, por meio da contagem de linfócitos T-CD4+, pode auxiliar na indicação de uma profilaxia contra as infecções oportunistas, e impedir que o indivíduo venha a ter uma falha virológica. (DHSS, 2014; GESIDA, 2018; EACS, 2018; Ministério da Saúde, 2018b).

Uma observação complementar ao conjunto é que em 2017, mesmo com a implantação do PCDT, quase 10% dos exames encaminhados continuam fora dos critérios, sendo estes rejeitados pelos SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais). Acredita-se que esta ocorrência pode ser atribuída a dois fatores: 1) necessidade do clínico médico em ter os resultados dos exames em mãos para realizar o acompanhamento do paciente, mas sem que tenha relevância clínica, e neste caso, caberia treinamento do corpo clínico; ou 2) pelo contato direto com o paciente o médico tem uma melhor percepção quanto à necessidade de realizar o exame, seja por motivos clínicos, seja para prescrever algum procedimento extra como a indicação de vacinação. O fato é que esta observação sugere que algum estudo complementar deva ser realizado, e mesmo para evitar gastos desnecessários com a coleta de amostra, incômodo ao paciente pela coleta de amostra sem necessidade, entre outros.

## 8. CONCLUSÃO

A presente revisão de publicações leva às seguintes conclusões:

- O exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ é importante para realizar o monitoramento dos indivíduos infectados com HIV, e sua exclusão não deve ser desconsiderada;
- A frequência trimestral ou quadrimestral do exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ é desnecessária em pacientes em tratamento, assintomáticos e com carga viral indetectável;
- É necessário que haja melhor orientação dos profissionais clínicos quanto à necessidade de solicitação de exame de pacientes fora dos critérios estabelecidos;
- O PCDT deve abrir um espaço para que a solicitação do exame de quantificação de linfócitos T-CD4+ seja sujeita ao julgamento do médico que acompanha o paciente ou pelo menos determinar que seja realizado pelo minimamente uma vez por ano.

## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABBOTT. **Manual de procedimentos operacionais Abbott Real Time**. BR- Versão 1.0. Abbott molecular, 2013.
- ALEXANDER, Thomas S. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. **American Society For Microbiology**, Ohio, v. 23, n. 4, p.249-253, Apr. 2016.
- AROSA, Fernando; CARDOSO, Elsa; PACHECO, Francisco. **Fundamentos da Imunologia**. 2. ed. : Lidel, 2012.
- AOKI, Valeria et al. Imunofluorescencia direta e indireta. **An Bras Dermatol**, [s.i], v. 4, n. 85, p.490-500. 2010.
- BAKER, Janson V. *et al.* Changes in inflammatory and coagulation biomarkers: a randomized comparison of immediate versus deferred antiretroviral therapy in patients with HIV infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, [S.l.], v. 56, n. 1, p. 36-43, 2011.
- BARRÉ SINOUSI, et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, [s.i], v. 220, 1983.
- BENTO, Luciana Oliveira. **Diversidade e prevalência de isolados do HIV-1 com mutações de resistência em pacientes do sudoeste goiano não expostos à terapia antirretroviral**. 2016. 93 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Goiás-regional, Jatai, 2016.
- BORGES, Murilo Guimarães. **Aplicação de protocolos e métodos de bioinformática para análise de sequenciamento de exomas humanos**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, Campinas, 2015.
- BUTTÒ, Stefano et al. Laboratory diagnostics for HIV infection. **Ann Ist Super Sanità**, Italy, v. 46, n. 1, p.24-33, dez. 2010.
- BRITO, Fabiano de Almeida. Detection of anti-nuclear antibodies by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for

the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. **Rev Bras Reumatol**, [s.i], v. 1, n. 54, p.13-20, jan. 2013.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, [s.i], v. 55, n. 4, p.611-622, abr. 2009.

CARRINGTON, Mary.; ALTER, Galit. Innate Immune Control of HIV. Cold Spring Harb. **Perspect. Med.** [S.I.], v. 2, n. 7, p. a007070, 2012.

CDC, **Centers For Disease Control And Prevention - Sistema de Classificação Revisto para Infecção pelo HIV e Vigilância Ampliada Definição de Caso para AIDS entre Adolescentes e Adultos.** 1993. Disponível em: <<https://bit.ly/2RTIx0c>>. Acesso em: 20 de nov. 2018,

COFFIN, John M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**. 267(5197):483-489.1995.

COHEN, Myron S et al. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. **J. Clin. Invest.**118:1244–1254.2008.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p.434-461, Julho 2010.

CUNICO, Wilson et al. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos HIV - highlights in drug research. **Química Nova**, [s.i], v. 31, n. 8, p.2111-2117, 8 nov. 2008.

DAAR, Eric S. et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. **Ann. Intern. Med**, [s.i], v. 134, n. 1, p.25-29, 2001.

DEEKS, Steven G et al. HIV Infection. **Nature Reviews**.vol.1.2015

DEEKS, Steven G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. **Annu. Rev. Med.**, [S.I.], v. 62, p. 141-55, 2011.

- Department of health and human (DHHS): **Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV**. 2014. Disponível em: < <https://bit.ly/2CnbeYx> >. Acesso em: 12 dez. 2018.
- DRAENERT et al. Compaction of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. **J Immunol Methods**. 275 (1-2): p.19-29. 2013
- DOURADO, Veras Barreira. Tendências da epidemia de Aids no Brasil após a terapia anti-retroviral. **Rev Saúde Pública** 40(Supl):9-17.2006.
- DOITSH, Gilad et al. Pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, [s.i], v. 7484, n. 505, p.509-517, 23 jan. 2014.
- European aids clinical society- EACS. **GUIDELINES October 2018**. Ed 9.1. Europa, 448p, 2018.
- FERREIRA, Patrícia Minosso. **HIV/AIDS e o farmacêutico no serviço de assistência especializado - SAE**, Faculdade de educação e meio ambiente, 2014.
- FIOCRUZ; CRUZ, Instituto Oswaldo. **O vírus da AIDS 20 anos depois: A epidemia da AIDS através do tempo**. Disponível em: < <https://bit.ly/1qczXiS> >. Acesso em: 7 nov. 2018.
- FRANKEL, Alan D; YOUNG, John A T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annu. Rev Biochem**. 67: 1–25.1998.
- FARIA, NR et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**. v.346, p.56–61.2014.
- GALLO, Robert C et al. Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, [s.i], abr. 1983.
- GELDERBLON, H.R et al. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. **Virology**. 156 (1): 171-6.1988.
- GIV, Grupo de Incentivo A Vida. **Medicamentos Anti-HIV**. Disponível em: <<https://bit.ly/2s3Lxla>>. Acesso em: 07 dez. 2018.
- GIVAN, Alice Longobardi. **Flow Cytometry: First Principles**. 2. ed. New York: Copyright © 2001 By Wiley-liss, Inc, 2001. 261 p. Disponível em: <<https://bit.ly/2RtckMQ>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

- GLYNNI, Kinahan, Druccée. **CD4 counting technologies for HIV therapy monitoring in resource-poor settings – state-of-the-art and emerging microtechnologies**. 2013.
- GRINDEM, C.B. Blood cell markers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Philadelphia. v.26, n.5, p.1043- 1065, 1996.
- Grupo de estudio del sida- SEIMC: GESIDA. **Plan nacional sobre el sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana**. Españã: Ministerio de Sanidad Serviços Sociales e Igualdad, 2018.
- GORSE, GJ, et al. Safety and Immunology of cytotoxic T- Lymphocyte polyetope DNA plasmid (EP HIV 1090) vaccine in healthy, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- uninfected adults. **Vaccine**. n.26, v.2, p215-223. 2008.
- HAHN, Beatrice H. et al. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. **Science**: American Association for the Advancement of Science, Alabama, v. 287, p 607-14, 28 jan. 2000.
- IWEALA, O.I. **HIV diagnostic tests: an overview**. *Contraception*, v.70. p.141-147, 2004.
- JOHNSTON, Margaret I.; FAUCI, Anthony S. An HIV Vaccine — Challenges and Prospects. *An Hiv Vaccine — Challenges and Prospects, Massachusetts*, v. 9, n. 359, p.0-2, ago. 2008.
- JANEWAY, CA Jr; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Immunol**, [s.i], v. 20, p.197-216, 2002.
- LAWN, Stephen D.; WOOD, Robin. Tuberculosis in Antiretroviral Treatment Services in Resource-Limited Settings: Addressing the Challenges of Screening and Diagnosis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s.i], v. 204, p.1159-116, 2011.
- LEVINSON, Warren. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- LEWIS, George K. Role of Fc-mediated antibody function in protective immunity against HIV-1. **Immunology**, [s.i], p.46-57, maio 2014.

- LADEIRA, Pedro Ribeiro Soares de; ISAAC, Cesar; FERREIRA, Marcus Castro. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev. Med (São Paulo)**, São Paulo, v. 1, n. 90, p.47-51, jan. 2011.
- MAGGIOL, Franco; LEONE, Sebastiano. CD4 + T Lymphocyte Recovery in Individual Human Immunodeficiency Virus Infection. **Clinical Infectious Diseases**, Italy, v. 51, n. 4, p.465-467, 2 July 2010.
- MATOS, Ana Barbara barroso. **Monitorização clínica e imunológica de doentes com Doença do Enxerto contra o Hospedeiro crónica após infusão de células T reguladora**. JLacerda Lab, IMM; Clínica Universitária de Hematologia, Lisboa, 2016.
- MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY JUNIOR, Charles. Innate Immunity. **The New England Journal of Medicine: Advances in Immunology**, v. 343, n. 5, p.338-344, ago. 2000.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2018a.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Ministério da Saúde; Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais, 2018b.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Manual Técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças**. Ministério da Saúde; Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais, 2018c.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Rede nacional de laboratório de CD4+/CD8+**. Ministério da Saúde; Departamento de Vigilância, prevenção e controle das IST, HIV/AIDS e Hepatites Virais. Disponível em: <<https://bit.ly/2FzNIL7>>. Acesso em: 22 nov. 2018d.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Genotipagem do HIV**. Ministério da Saúde; Departamento de vigilância e controle das IST, HIV/AIDS e das Hepatites Virais. Disponível em <<https://bit.ly/2SUM9ex>>. Acesso em: 12 nov. 2018e.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Historia da AIDS: Linha do tempo**. Ministério da Saúde; Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <<https://bit.ly/2Cmlbpg>>. Acesso em: 07 nov. 2018f.

- MINISTERIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Ministério da Saúde; Comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS – CONITEC, 2017.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Ministério da Saúde; Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais, 2013a.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV**. Ministério da Saúde, 2013b.
- MONTANER, Julio et al. **Association of highly active antiretroviral therapy coverage, population viral load, and yearly new HIV diagnoses in British Columbia, Canada: a population-based study**. The Lancet, [s.i], v. 376, n. 0, p.532-539, ago. 2010.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **História do Programa Nacional**. Brasília. Ministério da Saúde, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Estadual IST AIDS-SP 20 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicas e Diretrizes Terapêuticas: medicamentos excepcionais**. Brasília: Ministério da Saúde; Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2002a.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações para terapia antiretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV – 2002/2003**. Brasília: Comitê assessor para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, 2002b.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Definição Nacional de caso de AIDS, em indivíduos menores de 13 anos, para fins de vigilância epidemiológica**. Brasília: Cn-dst AIDS, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Revisão da definição Nacional de casos de AIDS em indivíduos com 13 anos ou mais, para fins de vigilância epidemiológica**. Brasília: Cn-dst Aids, 1988.
- MCMICHAEL, AJ, et al. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Send To Nat Rev Immuno**, [s.i], v. 1, n. 10, p.11-23, jan. 2010.

- MOORE, DM et al. Effect of baseline CD4 cell counts on the clinical significance of shortterm immunologic response to antiretroviral therapy in individuals with virologic suppression. **J Acquir Immune Defic Syndr.**52(3):357-363.2009.
- MORAES, Julia. **Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfocitos circulantes de bovinos da raça curralheiro.** Goiânia, 2008.
- NOVAIS, Caroline Monteiro; ALVES, Melissa Pires. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Barra Mansa/rj, v. 33, dez. 2004
- NEVES Jr I, MORGADO MG. Immunological evaluation of human immunodeficiency vírus infected individuals by cytometry. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 393-400; 2000.
- ONSONI, Ricardo de March et al. Avaliação de oito Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde por meio do instrumento AGREE II: um estudo piloto. **Questões Metodológicas: Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 6, p.1157-1162, jun. 2015.
- ORLOFF, G.M, et al., Penetration of CD4 T cells by HIV-1. The CD4 receptor does not internalize with 105 HIV, and CD4-related signal transduction events are not required for entry. **J. Immunol.** v. 146 n. 8: 2578-87, 1991.
- OSBORNE, Kevin. **Doença avança na África do Sul.** 2000. Disponível em: <<https://bbc.in/2TY86tB>>. Acesso em: 07 dez. 2018.
- PARHAM, Peter. **O sistema imune.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- PAUL, William E.. Fundamental Immunology. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v. 19, n. 5, p.996-997, nov. 1994.
- PEDERSEN, Court et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. **BMJ**, [s.i], v. 299, n. 2, p 154, July 1989
- PIOT, Peter; QUINN, Thomas C. Response to the AIDS Pandemic — A Global Health Model. **The new England Journal of Medicine**, England, v. 368, n. 23, p.2-3, ago. 2013.
- PLANTIER, Jean-christophe et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, p. 871-872. ago. 2009.

- PRIDDY, FH et al. Safety and immunology of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in healthy adults. **Clin infect dies.** v.46, n.11, p.1769- 812008.
- RAWIZZA, Holly E. et al. **Immunologic Criteria Are Poor Predictors of Virologic Outcome: Implications for HIV Treatment Monitoring in Resource-Limited Settings.** *Clinical Infectious Diseases*, [s.i], v. 53, n. 12, p.1283-1290, dez. 2011.
- ROITT, Ivan; ROBSON, Arthur. **Imunologia Básica.** [s.i]: Guanabara Koogan, 2003.
- RONSONI, Ricardo de March et al. **Avaliação de oito Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde por meio do instrumento AGREE II: um estudo piloto.** *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 6, n. 31, p.1157-1162, jun. 2015.
- ROSSI, Silvia Maria Gomes de et al. Impacto da terapia antirretroviral conforme diferentes consensos de tratamento da Aids no Brasil. **Panam Salud Publica**, [s.i], 32 (2) p.117-123, 2012.
- RUSSO, Ricardo Toledo et al. **Treinamento em quantificação de linfócitos T-CD4+/CD8+ por citometria de fluxo – plataforma BD FACSCalibur 4 cores.** 02. ed. Porto Alegre: Bdb Fas, 230 p. 2010.
- REECE, J. B, et al. Dideoxy chain termination method for sequencing DNA. **In Campbell biology.** Ed 10. p. 410. San Francisco. 2011.
- BASRI, Rehana; MOHAMAD, Wan. Neurological Manifestations of HIV-1 Infection and Markers for HIV Progression. **Web Of Science**, [s.i], v. 5772, n. 10, p.1-3, 10 abr. 2013.
- SAVI, Marcelo A.; SOUZA, Tiago R. A.. Dinamica da interação entre o sistema imunologico e o virus HIV. **C T**, [s.i], v. 16, n. 3. 1999.
- SCHECHTER, Marcia Rachid Mauro. **MANUAL DE HIV / AIDS.** 10. ed. Rio de Janeiro: Thieme Revinter Publicacoes Ltda -rj, 259 p, 2017.
- SECRETARIA DA SAÚDE. **Programa Estadual DST/Aids.** Disponível em: <<https://bit.ly/2VTo5uC>>. Acesso em: 30 nov. 2018

- SILVA, Juliane Andrade; MATA, Liliane Cunha Campos. Avaliação da adesão à terapia antirretroviral e do perfil imunológico de pacientes atendidos no centro Viva a Vida de sete lagoas- MG. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, 2011
- SILVA, Paulo Henrique et al. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Artmed, p 448. 2016.
- SILVA, Roberto Calado da. **Avaliação dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 em um teste de imunofenotipagem para a quantificação de linfócitos T, utilizando a citometria de fluxo**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.
- SPEZIA, Luiza Perissinotto; PICARELLI, Maria Elídia de Andrade; SANTOS, Ana Beatriz Rossetti. Avaliação da AIDS e da ocorrência de doenças oportunistas e sexualmente transmissíveis em pacientes infectados pelo HIV residentes na região de Indaiatuba, SP. **J Health Sci Inst**, Indaiatuba, v. 33, n. 4, p.303-308, 2015.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Traduzido de Microbiology: An Introduction. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- TEODORESCU, Lindinalva Laurindo; TEIXEIRA, Paulo Roberto. **Historias da AIDS no Brasil 1983 – 2003. As respostas governamentais à epidemia de AIDS**. v. 1. Brasília. Ministério da Saúde, 2015.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). Sanger sequencing method. Em *Sanger sequencing*. Disponível em <<https://bit.ly/1LgSM1Z>> Acesso em: 10 de dez. 2018.
- UNAIDS. **90-90-90 Uma meta ambiciosa de tratamento para contribuir para o fim da epidemia de AIDS**. Suíça: Oms, 2015.
- UNAIDS. **Fim da Aids até 2030**. 2016. Disponível em: <https://bit.ly/2T1Rtx3>. Acesso em 28 de nov. de 2018.
- UNAIDS. **ESTATÍSTICAS GLOBAIS SOBRE HIV 2017**. 2017. Disponível em: <<https://unaid.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

UNAIDS. **UNAIDS alerta: o progresso está lento e nosso tempo está acabando para alcançarmos as metas de HIV até 2020.** 2018. Disponível em:

<<https://bit.ly/2Mb0yRq>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

UNIÃO, Diário Oficial da. **LEI Nº 9.313, DE 13 DE NOVEMBRO DE 1996:** Seção 1 - 14/11/1996, Página 23725. Disponível em: <<https://bit.ly/2GMeay3>>. Acesso em: 04 dez. 2018.

VALLARI A et al. Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. **Journal of Virology.**85(3):1403-1407.2010.

YERLY, S; HIRSCHHEL, B. Diagnosing acute HIV infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**, [s.i], v. 1, n. 10, p.31-41, jan. 2012.