

Elaine Monteiro Matsuda

Diagnóstico da infecção pelo HIV-1:  
Proposta de um algoritmo para identificação de infecção  
aguda

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestra em Ciências.

**Área de Concentração:** Infectologia em Saúde Pública.

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido

SÃO PAULO

2015

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Matsuda, Elaine Monteiro.

Diagnóstico da infecção pelo HIV-1: proposta de um algoritmo para identificação de infecção aguda / Elaine Monteiro Matsuda. – 2015.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2015.

Área de concentração: Infectologia em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido.

1. HIV-1/genética. 2. Infecção/diagnóstico. 3. Soropositividade para HIV/diagnóstico. 4. Diagnóstico Precoces. 5. Resistência a Medicamentos/genética. 6. Epidemiologia Molecular/estatística & dados numéricos

SES/CCD/CD-317/2015

Ao meu pai por ter confiado em mim e investido no meu sonho. A minha mãe e irmã por sempre terem me apoiado nas minhas escolhas. Aos meus filhos, Fernanda e Luiz Eduardo por serem meus fãs incondicionais e por entenderem as minhas ausências.

## **Agradecimentos**

A Deus e ao universo por terem conspirado na concretização deste sonho.

Aos meus pacientes por terem confiado suas vidas, serem parte da minha família e que com eles e por eles continuamos na busca de dias melhores.

Aos meus pais Mitsuo Matsuda e Maria Cristina Monteiro Matsuda por terem acreditado no meu sonho e terem sido um exemplo de caridade e honestidade.

A minha irmã gêmea Eluiza Monteiro Matsuda pelo exemplo de superação.

Aos meus filhos Fernanda e Luiz Eduardo Matsuda Manzoni por serem o meu maior estímulo, por vocês quero ser exemplo de determinação.

Ao meu orientador Professor Doutor Luís Fernando de Macedo Brígido por ser muito mais que meu orientador, ter despertado a pesquisadora que existia dentro de mim e ter vibrado com cada conquista.

A Luana Portes Ozório Coelho por todo apoio na execução da parte laboratorial do projeto e amizade que construímos.

A toda equipe do Laboratório de Retrovírus do Núcleo de Doenças de Vinculação Sanguínea e Sexual, do Centro de Virologia, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pelo apoio.

Aos funcionários do Ambulatório de Referência em Moléstias Infecciosas de Santo André – ARMI. Que cada um se sinta abraçado, em especial a coordenadora do Programa Municipal de DST/AIDS Ana Aparecida Chong e a encarregada do ARMI Debora Fernanda Vichessi, grandes amigas, que tanto apoiaram e torceram por mim.

A Secretaria da Saúde do Município de Santo André, em especial a Dra. Noêmia Conceição Gil e a Enfermeira Fátima Aparecida Cotrim Soares por todo apoio nesta jornada.

A Vigilância Epidemiológica da Secretaria da Saúde do Município de Santo André por todo apoio na divulgação do projeto e no envio de informações.

A Gerência de Processo da Coordenação de Assistência e Tratamento do Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais/SVS do Ministério da Saúde, em especial a Juliana Uesono pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Carlos Roberto L. Sarni pela revisão de ortografia e gramática.

A todos aqueles que de alguma maneira incentivaram e acreditaram que este projeto beneficiaria os nossos pacientes. Aprendemos juntos! Meu muito obrigada!

## Resumo

A epidemia de AIDS em nosso País apresenta relativa estabilidade, concentrada em populações de maior vulnerabilidade, porém informações são em geral relacionadas à fase avançada da doença. Nosso estudo procura contribuir com informações sobre casos incidentes de infecção pelo HIV-1, através de um algoritmo que favorece a identificação de casos em fase aguda da doença. Esse algoritmo, com critérios clínicos e laboratoriais, permitiu o recrutamento consecutivo de 99 pacientes em um universo de cerca de 300 casos novos incorporados ao SAE do Município de Santo André, no período de outubro de 2011 a novembro de 2014. Nesses pacientes recém diagnosticados foram analisadas características clínicas, epidemiológicas e aspectos moleculares do HIV-1. Alguns aspectos clínicos e laboratoriais foram avaliados em adicionais 154 casos incorporados nesta época, assim como algumas características do HIV-1 identificadas em teste de genotipagem no período entre 2001 e 2014, em pacientes do mesmo SAE, que permitiram contextualizar a coorte. Entre os 99 pacientes, 83 (83,8%) eram homens, 70 (70%) HSH. A mediana de idade foi de 29,6 anos, e estes apresentaram, em comparação com os casos adicionais incorporados na mesma época, maior mediana de CD4 (466 contra 332,  $p=0,0011$ ), menor proporção de casos com CD4 menor de 200 céls/mm<sup>3</sup> (14% contra 28,8%,  $p=0,013$ ) e menos casos de tuberculose (3% contra 11,6%,  $p=0,029$ ). O algoritmo proposto identificou 5 casos em 8 suspeitos de infecção aguda. A genotipagem pré-tratamento avaliou, pela primeira vez na região, a resistência transmitida, identificando 6 (6,6%) casos com mutações de vigilância da WHO (Guimarães et al., 2015), com predomínio de subtipo B (74,4%) e uma proporção importante de casos de subtipo C (13,5%), significativamente superior aos pacientes com genotipagem no período de 2001-2014 do mesmo SAE (1,4%,  $p=0,0005$ ). Na coorte foi identificado ainda, por estudo clínico e epidemiológico, confirmado por associação filogenética, uma possível transmissão do HIV-1 por procedimento de manicure (Matsuda et al., 2014b).

## Abstract

The AIDS epidemic in our country shows a relative stability, concentrated in the most vulnerable populations, but the limited information is generally related to the advanced stage of the disease. Our study aims to contribute with information on incident cases of HIV-1 infection. In a universe of about 300 new cases incorporated into the Santo André AIDS Program from Oct/2011 to Nov/2014, 99 patients were recruited consecutively. The study evaluated patients admitted after a recent diagnostic through the usual demand for follow-up and from an active case finding, using clinical laboratory algorithm that aimed to identify patients with acute infection. Available clinical and laboratory data from 154 additional cases incorporated in the service during this period and molecular data from HIV-1 genotypic tests from patients of this service in the period of 2001-2012, allowed to contextualize the cohort findings. Among the 99 patients studied 83 (83.8%) were men, 70 (70%) men who have sex with men. The median age was 29.6 years. In comparison to other cases incorporated the same period, the cohort cases had a higher median CD4 (466 versus 332,  $p=0.0011$ ), a smaller proportion of cases with CD4 below 200 cells/mm<sup>3</sup> (14% versus 28.8%,  $p=0.013$ ) and fewer cases of tuberculosis (3% versus 11.6%,  $p=0.029$ ). The proposed algorithm has identified 5/8 cases of suspected acute infection. Pretreatment genotyping, evaluated for the first time in the region, showed WHO surveillance transmitted mutations in 6 (6.6%) cases, with predominant subtype B (74.4%) (Guimarães et al., 2015). Subtype C was observed in a significantly higher proportion than that among genotyped patients from the same outpatient (13.5% versus 1.4%,  $p=0.0005$ ) in the period 2001-2014. In the cohort, we identified, based in epidemiological clinical and subsequent phylogeny a possible transmission of HIV-1 for manicure procedure (Matsuda et al., 2014b).

**Palavras chave:** 1. HIV-1. 2. Infecção. 3. Soropositividade para HIV/diagnóstico. 4. Diagnóstico Precoce. 5. Resistência a Medicamentos. 6. Epidemiologia Molecular



## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AcNSS	Anticorpos neutralizantes espécie específica
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
al.	Colaboradores
AMP	Amprenavir
ARMI	Ambulatório de Referência em Moléstias Infecciosas
ARV	Antirretroviral
ASY	Assintomático
ATV	Atazanavir
ATV/r	Atazanavir e ritonavir
AZT	Zidovudina
CAgAC	Complexo Antígeno Anticorpo
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMIA	Quimioluminescência com micropartículas
col.	Colaboradores
CPR	<i>Stanford Calibrated Population Resistance Criteria</i>
CRFs	Formas recombinantes circulantes
CTA	Centro de Testagem e Aconselhamento
D4T	Estavudina
DDI	Didanosina
DEA	Dietilamina
DEA-Avidity Assay (DEA-EIA)	Teste de avidéz
DHHS	<i>Department of Health and Human Services</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DO	Densidade óptica
DR	Diagnóstico recente
DRV/r	Darunavir e ritonavir

DST	Doença sexualmente transmissível
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFZ	Efavirenz
ELISA	Testes imunoenzimáticos
ETR	Etravirina
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FPV/r	Fosamprenavir e ritonavir
FTC	Emtricitabina
gp	Glicoproteínas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-Ag	Teste de imunoenensaio enzimático para antígeno HIV
HPTN	<i>HIV Prevention Trials Network</i>
HSH	Homem que faz sexo com homem
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IAS	<i>Internacional Aids Society</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDV/r	Indinavir e ritonavir
IQR	Variação de interquartil
ITRN	Inibidor da transcriptase reversa
kb	Kilobases
LPV	Lopinavir
LPVr	Lopinavir coformulado com ritonavir
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MR	Mutações de Resistência
NFV	Nelfinavir
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NVP	Nevirapina
ODn	Densidade óptica normalizada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Profilaxia pós exposição

PR	Protease
PS	Mulheres profissionais do sexo
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/AIDS
RNA	Ácido ribonucleíco
rpm	Rotações por minuto
RPV	Rilpivirine
RT	Transcriptase Reversa
SAE	Serviço de Atendimento Especializado
SICLOM	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SIN	Sintomático
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SPIDER	Sistema Público de Incorporação, Diagnóstico e Retenção
SQV/r	Saquinavir e ritonavir
SRA	Síndrome retroviral aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
TasP	Tratamento como prevenção
TDF	Tenofovir
TDRM	<i>Transmitted drug resistance mutations</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TPV/r	Tipranavir e ritonavir
TRD	Teste Rápido Diagnóstico
UD	Usuários de drogas
UDI	Usuários de drogas injetáveis
W blot	Western blot
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo do genoma do HIV-1.....	18
<b>Figura 2</b> - História natural da infecção pelo HIV-1.....	22
<b>Figura 3</b> - Processo de Seleção do Grupo ARMI.....	30
<b>Figura 4</b> - Fluxograma de Diagnóstico de Infecção recente pelo HIV-1.....	39

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais na admissão  
Dos pacientes ..... 40
- Tabela 2:** Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, segundo  
o tempo de infecção no Grupo DR..... 44
- Tabela 3:** Estadiamento dos pacientes segundo as classificações do Centro  
de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and  
Prevention-CDC*) 1993 e 2014 e de acordo com mutações de resistência.. 46
- Tabela 4:** Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos casos  
com mutações associadas a resistência antirretroviral..... 47
- Tabela 5:** Dados clínicos, laboratoriais e estadiamento de cinco pacientes  
agudos com Síndrome Retroviral Aguda na  
admissão ..... 48

## Lista de Anexos

**Anexo 1:** Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Santo André, sob número CAAE: 04711312.5.1001.5482.

**Anexo 2:** Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz/Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo, sob número CAAE: 02298012.6.0000.0059.23685.

**Anexo 3:** Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido.

**Anexo 4:** Guimarães PM, Ferreira JL, Coelho LP, Cavalcanti JS, Lopes GI, Matsuda EM, et al. Transmitted drug resistance among recently diagnosed adults and children in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015 Mar 31.

**Anexo 5:** Descrição de casos relevantes do grupo DR.

**Anexo 6:** Matsuda EM, Coelho LP, Pimentel VF, Onias HB, Brígido LF. An HIV-1 transmission case possibly associated with manicure care. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014b Nov;30(11):1150-3.

**Anexo 7:** Considerações sobre mutações de resistência segundo o algoritmo de análise de resistência de *Stanford*, encontradas na genotipagem de admissão.

.

# Índice

<b>1.</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1	Histórico.....	16
1.2	Agente etiológico.....	17
1.3	Prevenção da infecção pelo HIV-1.....	19
1.4	Diagnóstico da infecção pelo HIV-1.....	21
1.5	Dados epidemiológicos.....	22
<b>2.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>25</b>
2.1.	Geral.....	25
2.2.	Objetivos específicos.....	25
<b>3.</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>26</b>
3.1.	População Estudada.....	26
3.1.1.	Casuística.....	26
3.2.	Avaliação dos dados clínicos e laboratoriais através dos sistemas informatizados oficiais.....	28
3.3	Definição das variáveis utilizadas na população estudada.....	31
3.3.1	Carga viral em log <sub>10</sub> .....	31
3.3.2	Classificação CDC 1993.....	31
3.3.3	Classificação CDC 2014.....	31
3.3.4	Clínica na admissão.....	32
3.3.5	Mutações de resistência.....	32
3.3.6	Mutações de resistência CPR.....	32
3.3.7	Índice de ambiguidade na polimerase.....	32
3.4	Metodologia laboratorial.....	33
3.4.1	Coleta de Material Biológico.....	33
3.4.2	Viremia total (Carga Viral) .....	33
3.4.3	Detecção de Infecção Recente pelo HIV-1.....	33
3.4.4	Isolamento RNA e sequenciamento viral.....	34

3.4.5	Quantificação de linfócitos TCD4 por citometria.....	35
3.4.6	Subtipo viral.....	36
3.4.7	Avaliação de resistência antirretroviral.....	36
3.4.8	Análise estatística.....	37
3.5	Comitê de ética em pesquisa.....	37
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
4.1	Descrição do Grupo Diagnostico Recente (DR) .....	41
4.1.1	Subtipo viral.....	42
4.1.2	Realização anterior de exame Anti-HIV.....	43
4.1.3.	Teste de avidéz.....	43
4.1.4	Avaliação de mutações de resistência no grupo DR.....	45
4.1.5	Descrição dos casos agudos.....	48
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>67</b>



# 1. Introdução

## 1.1. Histórico

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi primeiramente reconhecida nos Estados Unidos em 1981, ocasião na qual foram identificadas infecções oportunistas e casos de Sarcoma de Kaposi inexplicáveis, entre homens homossexuais da Califórnia e de São Francisco (CDC, 1981). A publicação em junho de 1981 de 5 casos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, ocorridos no período de outubro de 1980 a maio de 1981, em jovens previamente hígidos em Los Angeles, Califórnia, dos quais dois morreram, foi mais tarde reconhecida como a primeira publicação científica do que seria conhecido como AIDS (CDC, 2011).

Luc Montagnier e sua colega Françoise Barré-Sinoussi em 1983, foram os primeiros a relatar o isolamento de um novo retrovírus, posteriormente denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Por esta importante descoberta, estes pesquisadores do Instituto Pasteur de Paris, foram reconhecidos com o Prêmio Nobel de Medicina em 2008 (Gallo e Montagnier, 2011).

Na mesma ocasião Robert Gallo do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos, baseado em fatores epidemiológicos em associação com perda de linfócitos CD4 e imunossupressão, relacionadas a causas infecciosas, também postulou que um novo retrovírus seria o agente causal (Gallo et al., 1983).

Segundo o Ministério da Saúde no Brasil o primeiro caso de AIDS ocorreu em 1980 em São Paulo, porém foi definido somente em 1982 (Ministério da Saúde, 2015).

Nesses primeiros anos, ainda sem um teste diagnóstico, diferentes hipóteses sobre a etiologia da doença foram levantadas (Quagliarello, 1982) e mesmo após o isolamento e a identificação do HIV em 1983, pouco se conhecia da história natural da infecção.

O entendimento da história natural da infecção pelo HIV ficou mais claro a partir de 1986, quando foram descritos os primeiros casos de infecção aguda pelo HIV na literatura mundial. Apresentados clinicamente como síndrome da mononucleose e diagnosticados como agudos, baseado na verificação da soroconversão entre 14 e 20 dias da manifestação aguda (Buchanan et al., 1986; De Caluwé et al., 1987; Piette et al., 1987).

A história da luta contra a AIDS no Brasil foi marcada em 1984 pela organização do primeiro programa de controle da AIDS, o da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, sendo o estado que primeiro implantou uma rede de monitoramento dos níveis de células CD4. Posteriormente, foi implantada a Rede Nacional de Laboratórios para o monitoramento de pacientes com HIV em terapia antirretroviral, com a realização de exames de carga viral do HIV e contagem de células CD4 (Ministério da Saúde, 2015).

O acesso universal e gratuito à terapia antirretroviral (TARV), implantado no Brasil desde 1996, causou importante impacto na morbimortalidade por AIDS (Fazito-Rezende et al., 2010), com aumento da sobrevivência de pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) (Chequer et al., 1992; Marins et al., 2003; Matida et al., 2008). Esse tratamento foi reservado inicialmente para pessoas com evidências de imunodeficiência, como diminuição do número de células CD4 positivas ou manifestações clínicas, tendo essa indicação evoluído nos últimos anos para uma introdução mais precoce, ou mesmo para recomendações que incluem tratar todos os pacientes infectados (Brasil, 2013; DHHS, 2015; INSIGHT START, 2015).

## **1.2 Agente etiológico**

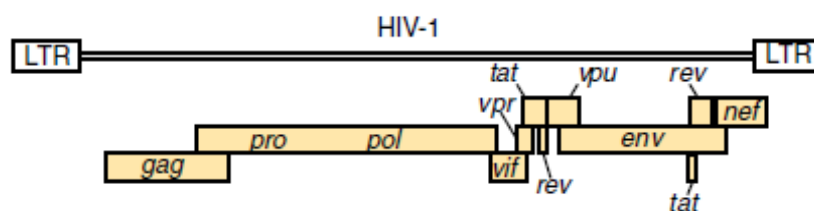
O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*). O HIV é relacionado ao vírus SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia) que infecta primatas não humanos. Quatro grupos de HIV-1 (M, N, O e P) já foram identificados. O grupo M é o mais diverso de todos, sendo o responsável pela pandemia, apresenta nove diferentes

subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), além de várias formas recombinantes circulantes (CRFs). O fato de que muitos chimpanzés são caçados e utilizados como alimento por populações africanas subsaarianas, associado às evidências de similaridades moleculares, sugerem fortemente uma origem zoonótica para o HIV-1 (Gao et al., 1999; Diaz e Vázquez, 2013).

Os retrovírus possuem um diâmetro de aproximadamente 100 nm e contém duas fitas simples de RNA, o que permite a recombinação entre elas (Mandell et al., 2010). O envelope viral é formado a partir da membrana citoplasmática da célula hospedeira, onde as glicoproteínas (gp) gp41 e gp120 estão inseridas. A partícula viral, *virion*, contém duas cópias de RNA viral, estabilizadas por um complexo de ribonucleoproteínas (p7 proteína Gag ou proteína do núcleo capsídeo), e três enzimas virais essenciais: a protease (PR), a transcriptase reversa (RT) e a integrase (Mandell et al., 2010; Diaz e Vázquez, 2013)

O genoma tem aproximadamente 10 kilobases (kb) e contém três genes estruturais principais denominados *gag*, *pol*, e *env*, sintetizados como poliproteínas precursoras que são posteriormente clivadas em suas proteínas ativas. São observados outros genes não estruturais denominados *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (Mandell et al., 2010; Diaz e Vázquez, 2013).

A figura 1 delinea a estrutura do genoma do HIV-1 (Mandell et al., 2010).



**Figura 1** – Esquema representativo do genoma do HIV-1.

### 1.3 Prevenção da infecção pelo HIV-1

O monitoramento clínico das PVHA, incluindo a cascata de cuidado contínuo, torna-se essencial para se conhecer os esforços necessários a maximizar os efeitos das intervenções e nortear as ações para conter o avanço da epidemia de HIV/AIDS (Boletim Epidemiológico, 2013; Nosyk et al., 2014).

O CDC em 2011 estimou que os esforços para prevenir 350.000 infecções pelo HIV no período de 1991 a 2006 nos Estados Unidos, resultaram numa economia em gastos com saúde de 125 bilhões de dólares (CDC, 2011).

O teste para o HIV é recomendado pelo menos uma vez na vida para todos os adultos e adolescentes, devendo ser repetido para os que estão em maior risco de contrair o HIV. Os médicos devem estar alertas para a possibilidade de infecção aguda pelo HIV e prontamente prosseguir os testes de diagnóstico (Marrazzo et al., 2014).

A implementação do tratamento com prevenção (TasP) tem sido reconhecida como uma das mais importantes medidas de saúde pública para o controle da transmissão do HIV (Montaner et al., 2010; Cohen et al., 2011b; Hull et al., 2014). Um potencial obstáculo ao controle da epidemia com TasP é o fato que, na fase aguda, esses pacientes potencialmente transmissores da infecção, não são facilmente identificados, estão virêmicos e a sorologia pode estar indeterminada ou negativa. Estes indivíduos com infecção aguda possivelmente contribuem de forma desproporcional para a transmissão do HIV (Wawer et al., 2005; Brenner et al., 2007).

No estudo HPTN 052 (do Inglês *HIV Prevention Trials Network*) publicado em 2011 com 1763 casais sorodiscordantes, com CD4 entre 350-550 céls/mm<sup>3</sup>, randomizados 1:1 para tratamento imediato ou adiado, 28 infecções ocorreram pelo parceiro positivo vinculado no estudo e em apenas um a infecção ocorreu no casal do grupo tratado, sugerindo a importância do tratamento como prevenção. Vale ressaltar que das 39 infecções ocorridas, 11 não foram com o parceiro vinculado no estudo, demonstrando a

importância da aquisição do HIV de um relacionamento com um parceiro não fixo (Cohen et al, 2011b). Estes resultados foram atualizados durante a última Conferência da Sociedade Internacional de AIDS em julho de 2015 (*8th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment & Prevention (IAS 2015) in Vancouver, Canada*) após dez anos do início do estudo e seguimento de 1.171 casais. Os investigadores relataram que o início da terapia antirretroviral precoce reduziu a transmissão do HIV em 93 por cento durante o curso do estudo, sendo que esta ocorreu em apenas oito casos no parceiro não infectado do grupo tratado. Quatro dessas infecções foram diagnosticados logo após o início do tratamento ARV e nas outras quatro, ocorreram em participantes em falha ARV, estando todos virêmicos. (Cohen et al, 2015). (Disponível em <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2015/Pages/HPTN052results.aspx>).

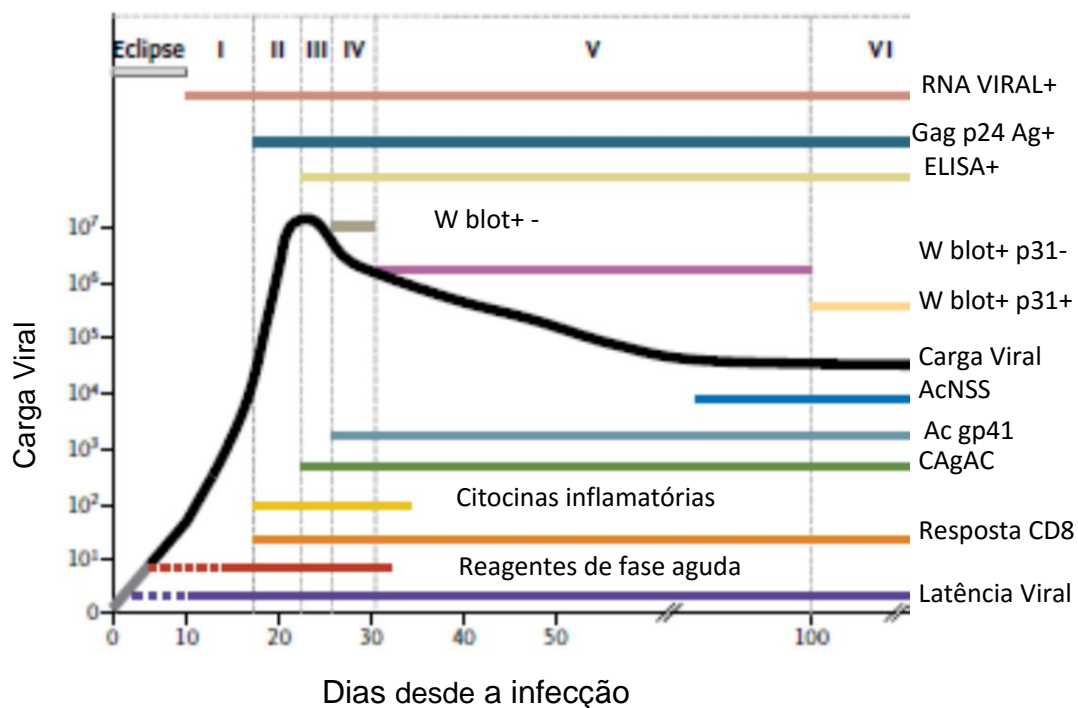
Além da importância de tratar como medida para prevenir novas infecções, o tratamento dos indivíduos na fase aguda permite reduzir a replicação residual, limitar a diversidade viral e os reservatórios, preservar a imunidade inata e a função das células T e B, além de acelerar a restauração imune (Sáez-Cirión et al.,2013; Li and Ghandi, 2014). Sáez-Cirión e col. identificaram 14 pacientes controladores de elite pós tratamento, onde a viremia permaneceu controlada por vários anos após a interrupção de prolongado tratamento (Controlador de elite pós tratamento) iniciado na infecção primária. A probabilidade de controle viral foi estimada em 15% após a interrupção do tratamento recebido por 24 meses, proporção muito maior que nos controladores de elite espontâneos, onde não passa de 1% (Sáez-Cirión et al.,2013). Podemos esperar que esse controle os torne também transmissores pouco eficientes.

## 1.4 Diagnóstico da infecção pelo HIV-1

O diagnóstico da infecção pelo HIV-1 depende do entendimento da história natural e em que fase da infecção o indivíduo se encontra.

A figura 2 adaptada de Cohen e col. (Cohen et al., 2011a), demonstra a história natural e a imunopatogênese do HIV-1. A temporalidade da progressão da infecção pelo HIV-1 pode ser descrita em seis fases, classificadas de I a VI. O diagnóstico da infecção aguda e recente baseia-se no aparecimento sequencial no plasma do RNA viral do HIV-1; do antígeno p24; de anticorpos específicos contra o HIV-1, detectados com a utilização de testes imunoenzimáticos (ELISA); e anticorpos que se ligam a proteínas virais, incluindo a p31, detectados por Western blot. O HIV-1 pode não ser detectado nos primeiros dias após a infecção, numa fase chamada de eclipse, por um período de 7 a 21 dias. Testes imunoenzimáticos mais sensíveis, de quarta geração, que detectam antígenos e anticorpos, diminuem o tempo para soroconversão em cerca de 5 dias e se associados a pesquisa do RNA do HIV-1, mais 7 dias são ganhos entre a infecção e o diagnóstico.

A adição de uma etapa de triagem RNA HIV para amostras negativas de anticorpos anti-HIV é uma abordagem precisa e viável na identificação dos casos de infecção aguda (Pilcher et al., 2005; Patel et al., 2006; Priddy et al., 2007).



**Figura 2 – História natural da infecção pelo HIV.**

Exames laboratoriais que podem ser realizados (descritos a direita), um sinal de mais (+) indica um resultado do teste positivo, um sinal de menos (-) um resultado negativo, e uma mais-menos (+ -) um resultado limítrofe-positivo. O eixo inferior se inicia no dia zero da infecção. O segmento em cinza na linha preta de carga viral indica a incapacidade de detectar cargas virais muito baixas (não detectada, fase de eclipse) (adaptado de Cohen, 2011a). W blot- Western blot; AcNSS – Anticorpos neutralizantes espécie específica; Ac- Anticorpo; CAgAC – Complexo Antígeno Anticorpo.

## 1.5 Dados epidemiológicos

Segundo o último Boletim Epidemiológico de 2014 de AIDS e DST do Ministério da Saúde, foram adotados desde o ano de 2004 procedimentos de relacionamento das bases de dados, visando corrigir a subnotificação de casos no *Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)*, de modo a permitir um melhor conhecimento do cenário epidemiológico. Os sistemas de informação relacionados são além do *SINAN*: o *Sistema de Informação de Mortalidade (SIM)*, o *Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL)* e o *Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLON)*.

Desde o início da epidemia de AIDS no Brasil até junho de 2014, foram registrados no país 757.042 casos de AIDS, sendo 593.217 (78,4%) notificados no SINAN, 42.006 (5,5%) e 121.819 (16,1%) no SIM e SISCEL/SICLON, respectivamente, identificados pelo relacionamento probabilístico dos dados como subnotificação do SINAN.

A maior concentração dos casos de AIDS no Brasil está entre os indivíduos com idade entre 25 a 39 anos em ambos os sexos; entre os homens, essa faixa etária corresponde a 54,0% e entre as mulheres 50,3% do total de casos desde 1980 a junho de 2014. Entre os homens, observa-se um aumento estatisticamente significativo da taxa de detecção entre aqueles com 15 a 19 anos, 20 a 24 anos e 60 anos ou mais nos últimos dez anos; destaca-se o aumento da taxa em jovens de 15 a 24 anos, observando-se, entre aqueles com 15 a 19 anos, um aumento de 120,0% e entre os de 20 a 24, de 75,9%, no período de 2004 a 2013. Entre aqueles com 35 a 39 anos e 40 a 44 anos, observa-se uma tendência significativa de queda da taxa, representando 21,9% e 23,6% de redução de 2004 para 2013, respectivamente.

Desde o início da epidemia de AIDS (1980) até dezembro de 2013, foram identificados 278.306 óbitos tendo como causa básica a AIDS (CID10: B20 a B24), sendo a maioria na região Sudeste (61,8%), seguida do Sul (17,3%), Nordeste (11,9%), Centro-Oeste (5,0%) e Norte (4,0%). Em 2013, a distribuição proporcional dos 12.431 óbitos foi de 44,0% no Sudeste, 21,2% no Sul, 20,0% no Nordeste, 9,1% no Norte e 5,8% no Centro-Oeste. Avaliando o coeficiente de mortalidade padronizado, observa-se uma tendência significativa de queda nos últimos dez anos para o Brasil como um todo, o qual passou de 6,1 óbitos para cada 100 mil habitantes em 2004 para 5,7 em 2013, representando uma queda de 6,6%. No entanto, essa mesma tendência não se observa em todas as regiões do país; apenas as regiões Sudeste e Sul apresentam tendência significativa de queda, sendo esta mais acentuada no Sudeste (26,3%) (Ministério da Saúde, 2014).

Na população de 15 a 49 anos, a prevalência estimada é de 0,6%, sendo 0,7% em homens e 0,4% em mulheres. Entre os jovens de 17 a 21



anos do sexo masculino, a prevalência estimada em 2007 foi de 0,12% e 1,2% nos homens que fazem sexo com homens (HSH) da mesma faixa etária (Szwarcwald, 2009).

Nos grupos populacionais em situação de maior vulnerabilidade, as taxas de prevalência de HIV encontradas em estudos realizados no Brasil foram de 5,9% entre usuários de drogas (Bastos, 2009), 10,5% entre HSH (Kerr, 2009) e 4,9% entre mulheres profissionais do sexo (Szwarcwald, 2009).

Outro estudo, realizado mediante uma parceria entre o Ministério da Justiça e o Ministério da Saúde/Fiocruz com usuários de crack em 2013, encontrou uma prevalência de 5,0% (Bastos e Bertolini, 2014).

O IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) estimou a população brasileira em 202,7 milhões de pessoas em primeiro de julho de 2014, sendo que a População estimada em Santo André foi de 707.613, numa área da unidade territorial (km<sup>2</sup>), 175,781, correspondendo a uma densidade demográfica (habitantes/km<sup>2</sup>) de 3.848,01 (IBGE, 2015).

O Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais estima aproximadamente 734 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil no ano de 2014, correspondendo a uma prevalência de 0,4% (Boletim Epidemiológico, 2013). Deste modo, estima-se que o Município de Santo André tenha algo em torno de 2830 pessoas vivendo com HIV/AIDS. Nosso estudo procura contribuir no entendimento da dinâmica epidêmica de Santo André, através da proposta de um algoritmo para identificar e incorporar casos em fase aguda da infecção pelo HIV-1.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Geral**

Promover a identificação da infecção incidente pelo HIV-1 na região de Santo André através da utilização de um fluxograma de identificação, diagnóstico e incorporação, ao SUS, de pessoas vivendo com HIV/AIDS em fase inicial de doença.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Criar um fluxo de identificação, diagnóstico e incorporação de pacientes em fase aguda da doença - SPIDER (Sistema Público de Incorporação, Diagnóstico e Retenção);
- Organizar uma coorte de pessoas vivendo com HIV/AIDS com diagnóstico recente encaminhadas por serviços ou identificadas;
- Identificar os principais sinais e sintomas relacionados à infecção aguda nessa população;
- Verificar as características epidemiológicas dessa população;
- Avaliar a presença de resistência transmitida;
- Avaliar os bancos de dados oficiais para contextualizar a coorte frente ao total de pacientes incorporados no SAE, no mesmo período.

### **3. Metodologia**

#### **3.1. População Estudada**

##### **3.1.1. Casuística**

Estudo observacional de indivíduos maiores de 18 anos, identificados por profissional da saúde da região como casos de possível infecção aguda pelo HIV (fluxo I) e de parte dos pacientes que procuram o serviço de atenção especializada (SAE-ARMI) após diagnóstico recente de infecção pelo HIV-1 (fluxo II).

Estes indivíduos, após consentirem, foram testados para o HIV e, caso positivo, foram convidados a participar, e após consentirem por escrito, foram incluídos no Projeto de Pesquisa “Diagnóstico da infecção pelo HIV-1: Proposta de um algoritmo para identificação de infecção aguda” os seguintes casos:

#### **Fluxo I:**

##### **Critérios de inclusão no fluxo I:**

Paciente com HIV negativo (teste rápido ou sorologia) que apresente *exposição de risco entre 1 e 4 semanas antes do início dos sintomas* compatíveis de infecção aguda\* e sem critérios de exclusão.

*\*Critérios para definição de casos compatíveis com infecção aguda:* Pacientes que apresentam febre e pelo menos 2 sinais ou sintomas compatíveis com Síndrome Retroviral Aguda a seguir: faringite, exantema, cefaleia, mialgia, artralgia, mal-estar, úlceras orais, adenomegalia, irritação meníngea e/ou perda de peso.

**Critérios de exclusão no fluxo I:**

Foram excluídos pacientes com ausência de exposição de risco nas últimas 4 semanas, e/ou aqueles na qual os sintomas de suposta infecção aguda pelo HIV estão associados a outra doença crônica (ex.: artrites, alergias, enxaqueca, fibromialgia, depressão) ou a outra doença aguda (Infecções virais de vias aéreas superiores, como resfriado, gripe, ou infecções bacterianas como otite, sinusite, pneumonia).

**Fluxo II****Critérios de inclusão no fluxo II:**

Pacientes recentemente identificados como HIV positivo.

**Critérios de exclusão no fluxo II:**

Pacientes com uso atual ou anterior de antirretroviral foram excluídos, exceto uso por profilaxia por período inferior a 30 dias.

Foi lido e entregue o termo de consentimento livre e esclarecido para aceitação, ou não, pelo participante, sendo uma cópia do consentimento esclarecido assinado e adicionado ao seu prontuário (anexo 3 - modelo termo de consentimento livre e esclarecido). Após consentimento esclarecido foi realizada pequena entrevista e aconselhamento, que foi adequada à situação de vulnerabilidade relatada pelo paciente. Exames laboratoriais para diagnóstico do HIV foram realizados com a maior brevidade possível naqueles com situação de risco que apresentavam exame inicial negativo para o HIV e sintomas compatíveis com infecção aguda. Nos casos assintomáticos com exposição de risco dentro de 6 semanas anteriores e exame inicial negativo, a testagem para o HIV foi repetida em 30 dias ou menos. Nos casos diagnosticados como portadores do HIV foram solicitados os exames admissionais preconizados pelo Programa Nacional de DST/AIDS.

### **3.2. Avaliação dos dados clínicos e laboratoriais através dos sistemas informatizados oficiais**

A partir dos dados disponíveis no SINAN/SISCEL/SICLOM realizou-se uma análise dos casos recém diagnosticados e incorporados ao SAE de Santo André no período do estudo, de outubro de 2011 a novembro de 2014, visando obter informações da população total. Lembrando que pacientes diagnosticados e acompanhados no sistema privado, sem uso de antirretrovirais não constam no SISCEL e SICLOM.

A Gerência de Processo da Coordenação de Assistência e Tratamento do Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais/SVS do Ministério da Saúde, enviou o banco de dados do SISCEL e do SICLOM com registros dos pacientes com primeira entrada no Programa de DST/AIDS do Município de Santo André, no período de outubro de 2011 a novembro de 2014.

Listamos abaixo as planilhas em *Excel* enviadas e analisadas, e seu conteúdo:

1. Planilha de CD4 com pacientes que realizaram a primeira coleta, data e respectivo resultado, colhidos no serviço ARMI, no período do estudo: *507 registros*.
2. Planilha de Carga Viral com pacientes que realizaram a primeira coleta, data e respectivo resultado, colhidos no serviço ARMI, no período do estudo: *612 registros*.
3. Planilha de dispensação de antirretroviral no ARMI, com nome dos pacientes, antirretrovirais retirados e data por cada paciente no período do estudo: *39020 registros*.

Para se obter as informações dos outros pacientes que foram diagnosticados e incorporados no serviço no período do estudo, porém a quem o estudo não foi oferecido, foi utilizada como planilha base a planilha

de carga viral com a primeira entrada dos pacientes (item 2), por conter mais registros que a de CD4. Esta planilha continha inicialmente 612 registros, foram excluídos os seguintes registros:

- de pacientes menores de 16 anos, pois o mais jovem paciente do grupo do grupo do estudo tinha 17 anos (fato observado posteriormente a inclusão): *excluídos 62 registros.*

- de pacientes sem viremia detectada, pois esta situação somente seria possível em pacientes que realizam esse primeiro exame ainda sem o uso de antirretroviral, em casos de (i) indivíduos não infectados, incluindo casos com diagnóstico sorológico errôneo, (ii) erro laboratorial do teste de carga viral ou (iii) ou se o paciente fosse controlador de elite, situação que corresponde a menos de 1% da população HIV: *excluídos 157 registros.*

Deste modo, a partir dos 612 registros iniciais da planilha de carga viral de pacientes que realizaram a primeira coleta no período do estudo, foram excluídos 62 menores de 16 anos e 157 avirêmicos, em seguida foram incluídos 46 registros de pacientes que estavam somente na planilha de CD4, a planilha resultante conteve então 439 pacientes registrados. Estes foram novamente verificados nos bancos do SINAN e SICLOM, excluíram-se as duplicidades, os pacientes que já estavam incluídos no grupo de estudo mais detalhado (definido como Grupo DR: Diagnóstico Recente) e pacientes com um primeiro exame positivo ou uso de ARV , verificado no SINAN ou no SICLOM, prévio ao período do estudo. Após esta nova verificação, este grupo foi denominado Grupo ARMI e contava com 200 pacientes. Destes 200, 60 pacientes não continham registro no SINAN e SICLOM. Foi buscado o prontuário destes sessenta pacientes que originalmente estavam no SISCEL, com a primeira entrada no período do estudo, visando confirmar se a data do diagnóstico foi no período do estudo. Quarenta e cinco casos foram excluídos após verificação de prontuário: 17 por diagnóstico prévio ao período do estudo, 14 por se tratarem de pacientes oriundos ou em acompanhamento em outros serviços e 14 por prontuário não encontrado. A planilha final resultante deste processo de seleção continha 155 registros (pacientes), este Grupo ARMI serviu para verificar o contexto na qual se

encontravam os pacientes do Grupo DR. A figura 3 resume o processo de seleção dos pacientes do Grupo ARMI.

Em abril de 2015 foram avaliados os bancos de dados do SINAM e verificado se os pacientes pertencentes ao Grupo DR e ARMI haviam sido diagnosticados com tuberculose e se tinham óbito notificados no SINAM. Os casos com óbito o prontuário foi buscado para informações adicionais.

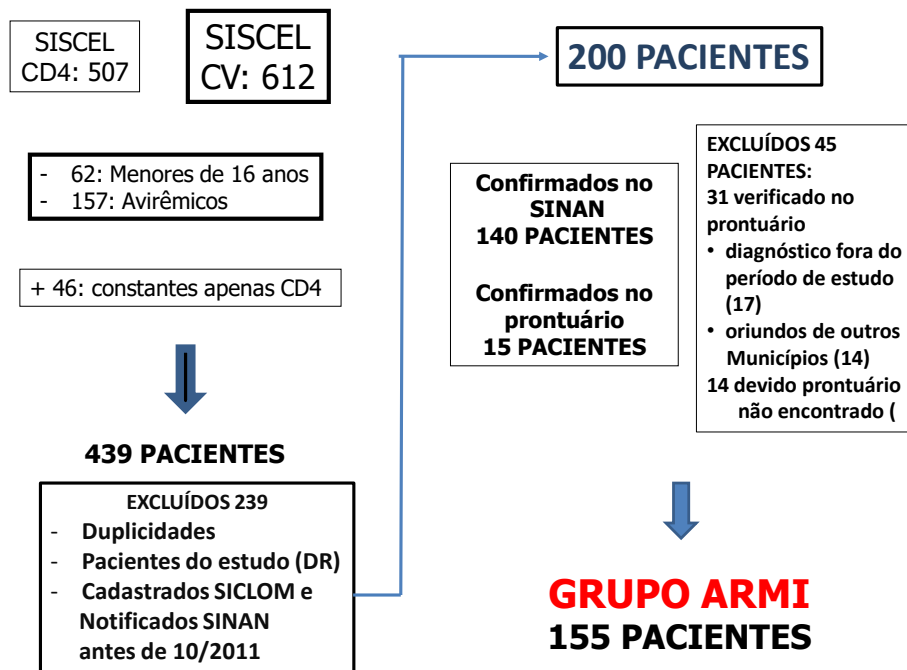


Figura 3: Processo de Seleção do Grupo Armi

### 3.3 Definição das variáveis utilizadas na população estudada

- 3.3.1 *Carga viral em log<sub>10</sub>*: foi registrada como 1 se não detectada e 1,3 se abaixo do limite de detecção de 40 ou 50 cópias/mL. Nos casos com viremia acima do limite de detecção, foi usado 5,7 para cargas virais acima de 500.000 cópias/mL e 7 para cargas virais acima de 10.000.000 cópias/mL, sendo estes valores usados nos cálculos de mediana.
- 3.3.2 *Classificação CDC 1993*: Os pacientes do estudo foram classificados, segundo apresentação clínica na admissão, conforme a Classificação de Estágio de Infecção pelo HIV proposta em 1993 pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention-CDC*) (CDC 1993). Essa classifica em estágios: A (infecção aguda ou assintomática), B (sintomática, mas não A ou C) e C (sintomática com doença definidora de AIDS), e subclassifica segundo o CD4 em: 1 (se maior que 500 céls/mm<sup>3</sup>), em 2 (200 e 499 céls/mm<sup>3</sup>) e 3 (menor que 200 céls/mm<sup>3</sup>) (CDC, 1993).
- 3.3.3 *Classificação CDC 2014*: Os pacientes foram ainda classificados segundo a Classificação de Estágio de Infecção pelo HIV, revisão 2014 do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention-CDC*), similar ao de 1993, porém introduz algumas mudanças, em especial um importante novo estágio, o estágio 0: infecção recente (soroconversão documentada dentro de 6 meses). E de acordo com o CD4 em: *estágio 1* (CD4 ≥ 500), *estágio 2* (CD4 200-499) e *estágio 3* (CD4 < 200 ou doença indicativa de AIDS). Os estágios 1 a 3 só se aplicam para casos sem documentação de soroconversão dentro de um período de 6 meses, pois independente de clínica ou CD4, estes são classificados como estágio 0 (CDC, 2014).



- 3.3.4 *Clínica na admissão:* Foram considerados dados clínicos como sinais, sintomas, exame físico e os epidemiológicos disponíveis, que permitiram categorizar os indivíduos como: *asy-assintomático*, *sin-sintomático* (com sintomas relacionados a AIDS ou AIDS) e *sra-síndrome retroviral aguda* (definida na página 26).
- 3.3.5 *Mutações de resistência:* foram consideradas como mutações de resistência as alterações nos aminoácidos presentes em determinadas posições, códons, considerados como associados à resistência a um ou mais medicamentos antirretrovirais segundo o algoritmo de análise de resistência de *Stanford* (*Stanford HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm – GRI, Version 7.0, last updated 02/27/14*).
- 3.3.6 *Mutações de resistência CPR:* para fins de comparabilidade com outros estudos epidemiológicos de resistência foram consideradas apenas as mutações da lista de mutações padronizadas para estudos de epidemiologia molecular, utilizadas para vigilância de resistência aos antirretrovirais pela WHO (Wensing et al., 2014), descritas e analisadas no CPR (*Stanford Calibrated Population Resistance Criteria*).
- 3.3.7 *Índice de ambiguidade na polimerase:* foi calculado como o número de posições com possível mistura de nucleotídeos (ACTG) observados na sequência, dividido pelo número total de nucleotídeos e multiplicado por 100. O código de mistura N, que significa mistura não resolvida dos quatro nucleotídeos, não foi incluído nem no denominador, nem no numerador do cálculo. A porcentagem das bases ambíguas (R, Y, K, M, S, W, B, D, H, V ou N) em cada sequência foi calculado usando os programas BioEdit (Hall, 1999) e Excel.

### 3.4 Metodologia laboratorial

#### 3.4.1 Coleta de Material Biológico

O sangue periférico foi coletado em tubo contendo anticoagulante (EDTA), no SAE e enviado ao Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz Central para processamento imediato (menos de 6 horas). O material foi fracionado por centrifugação 2.000 rpm por 20 minutos e o plasma e *buffy coat* (anel leucocitário) foram aliquotados e armazenados a -70 °C até o uso.

#### 3.4.2 Viremia total (Carga Viral)

O número de cópias de RNA viral no plasma foi quantificado pela metodologia *branched DNA* (*Siemens, EUA*) até junho 2014 e utilizando o *rtPCR* (*Abbott, EUA*) após junho 2014, com resultado expresso em número de cópias ou  $\text{Log}_{10}$  partículas por mL. A quantificação da carga viral do HIV-1 foi realizada por um dos laboratórios da Rede Pública de Laboratórios Especializados na Quantificação do RNA plasmático do HIV-1, com equipamentos e reagentes padronizados, disponibilizados pelas respectivas empresas; esses laboratórios fazem parte da rede nacional e são avaliados e aprovados periodicamente por programas de controle de qualidade externo, gerido pelo Ministério da Saúde.

#### 3.4.3 Detecção de Infecção Recente pelo HIV-1

Parte das amostras de soro foram submetidas a ensaio para caracterização do tempo de infecção, teste de avidéz (***DEA-Avidity Assay***), visando a identificação de infecções recentes.

O teste de avidéz (***DEA-EIA***) (Hauser et al., 2014) utilizou como base o kit de reagentes de ELISA, comercialmente disponível, denominado

Genetic Systems HIV-1/HIV-2 Plus O EIA (produzido pelo Laboratório Bio-Rad, EUA) tendo sido realizado as seguintes modificações: o volume de 100 µL da amostra de soro foi diluído em tampão de incubação na proporção de 1:10; a temperatura da primeira incubação foi de 4° C e a segunda incubação foi feita na presença ou ausência (paralelamente) de dietilamina (DEA) 0,1M. Os pares de valores de densidade óptica (DO 450nm) das amostras (com e sem DEA) foram utilizados no cálculo do índice de avides de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Índice de avides (\%)} = [\text{DO 450nm (DEA)} / \text{DO 450nm (sem DEA)}] \times 100$$

Índice de Avides  $\geq$  40%: indicativo de infecção crônica pelo HIV ( $\geq$  239 dias pós-soroconversão);

Índice de Avides  $<$  40%: indicativo de infecção recente pelo HIV ( $<$  239 dias pós-soroconversão). Este protocolo, portanto, permite avaliar amostras de soro ou plasma e identificar amostras de infecção em fase mais recente, com um tempo de infecção estimado de aproximadamente até 238 dias, e amostras com infecção estabelecida, com período de infecção superior a 239 dias.

#### 3.4.4 Isolamento RNA e sequenciamento viral

RNA viral presente em plasma criopreservado foi extraído (*QIAmp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany ou Abbott M200 Extractor*) e amplificado por uma metodologia adaptada (*“in house”*). A amplificação parcial da polimerase (códon 1-235 relacionados ao HXB2, acesso número K03455) foi obtida usando iniciadores (*“primers”*) previamente descritos (Guimarães et al. 2015) em uma reação de *Nested PCR*.

A reação de RT-PCR (retrotranscrição e a primeira amplificação de DNA em uma única reação) foi realizada utilizando 10 µL de RNA viral em uma mistura de reagentes com volume de 50 µL contendo tampão *High Fidelity*, 50mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM deoxynucleoside trifosfatos (*Life*

*Technologies, EUA*), 0,1 mM DTT, 10U Inibidor de RNase (*New England Biolabs, UK*), 50 U de *RT SuperScript III* (*Life Technologies, EUA*), 1.25U Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (*Life Technologies, EUA*), e 10  $\mu$ M de cada um dos iniciadores (GAG2:-GAGGAAGCTGCAGAATGGG) e (RT137: TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC ). A RT-PCR foi mantida a 50° C durante 30 min e 94°C durante 5min, seguido de ciclos de amplificação: 18 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 68°C durante 2 min 30 segundos; 17 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos, 68°C durante 2 min 30 segundos, e uma etapa final a 68°C durante 10 min. Um volume de 2,5  $\mu$ l do produto de RT-PCR foi utilizado numa nested PCR realizada com *Go Taq Verde Master Mix 2X* (*Promega Biosciences, EUA*) e 10  $\mu$ M de iniciadores (PR3:AGAGCCAACAGCCCCACCA) e (RT12:ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA). O nested PCR foi realizado a 94°C por 3 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, para 55°C por 30 segundos, 72°C durante 1 minuto e 30 segundos, e uma etapa final a 72°C durante 10 min. Um fragmento único de aproximadamente 1112 pares de bases foi sequenciado com *Big Dye* utilizando oito *primers* para cobrir parte da região *pol* (códon 1-235). As sequências foram editadas manualmente utilizando software *Sequencher 4.7* (*Gene Codes, EUA*). Bases ambíguas de DNA (misturas) foram consideradas em edição de sequências e foram contados como um códon associada à resistência quando um ou mais aminoácidos foram associados a mutações de resistência (Guimarães et al., 2015).

#### **3.4.5 Quantificação de linfócitos CD4 por citometria**

A quantificação de marcadores de subpopulações celulares T CD4+, CD8+ e CD45 foi realizada por citometria de fluxo seguindo as instruções do fabricante (Facscalibur, Biosciences, BD, EUA). No estado de São Paulo, a contagem de células T CD4/CD8 é realizada pela Rede Pública de Laboratórios Especializados na Contagem de Linfócitos T CD4/CD8, com

anticorpos monoclonais fluorescentes específicos para os receptores CD3, CD4, CD8 e CD45 (Biosciences, BD, EUA).

### 3.4.6 Subtipo viral

Análise do subtipo do HIV-1 foi realizada por diferentes metodologias, com uma triagem utilizando a ferramenta do *NCBI Genotipagem* (do Inglês *National Center for Biotechnology Information*), disponível no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi> e a ferramenta REGA HIV (*REGA Institute at the Katholieke Universiteit Leuven, Belgium*), disponível no endereço eletrônico: <http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/>. A subtipagem foi confirmada por análise filogenética usando o programa *BEAST v1.7.4*, sob o Modelo *GTR + I + G*. Nos casos descritos no anexo 5, a similaridade entre as sequências das amostras em estudo (conforme análise do site de *Stanford db*), está descrita como percentagem para PR e RT.

Para fins de avaliação da proporção de subtipo na população estudada, a presença de subtipos foi comparada com banco de dados de sequências de pacientes atendidos no mesmo serviço, e que realizaram genotipagem no Laboratório de Retrovírus do IAL de 2001 a 2014 por falha virológica, permitindo a comparação da prevalência dos diferentes subtipos e formas recombinantes entre os casos mais antigos no serviço, com os casos mais recentemente incorporados a atenção que foram identificados nesse estudo.

### 3.4.7 Avaliação de resistência antirretroviral

Mutações de resistência (MR) foram consideradas como alterações nos aminoácidos presentes em posições, códons, associados a resistência a um ou mais medicamentos antirretrovirais, utilizadas no algoritmo de análise

de resistência de *Stanford* (*Stanford HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm – GRI, Version 7.0, last updated 02/27/14*). Destas, para fins de comparabilidade com outros estudos epidemiológicos de resistência, foram consideradas as mutações da lista de mutações padronizadas para estudos de epidemiologia molecular utilizadas para vigilância de resistência aos antirretrovirais pela WHO (Wensing et al., 2014), descritas e analisadas no CPR (*Stanford Calibrated Population Resistance Criteria*).

#### **3.4.8 Análise estatística**

Os dados foram armazenados em banco de dados *EpiInfo6* (CDC) e *Excel*. O *Epi6* foi utilizado para determinar o Intervalo de confiança 95% (IC 95, mid-p) e para analisar os Itens categóricos dicotômicos em tabela de contingência 2x2, utilizando o teste *Fisher exact* ou *Yates corrected*, quando aplicável. Os testes de *Mann Whitney* e *Kruskal-Wallis* foram feitos através do *software PrismaGraphPad*. Os resultados de variáveis contínuas foram expressos em medianas, sendo descritos os percentis 25th e 75th (IQR). Intervalo de confiança 95% (CI95%), sendo adotado um nível de significância de  $p < 0.05$ , bicaudal, em todas as análises.

### **3.5 Comitê de ética em pesquisa**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Santo André, sob número CAAE: 04711312.5.1001.5482 (anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz/SES, sob número CAAE: 02298012.6.0000.0059.23685 (anexo 2). Os pacientes incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 3).

#### 4. Resultados

Tomando como base o fluxograma de diagnóstico de infecção recente pelo HIV abaixo descrito na figura 4 (Fluxo SPIDER - Sistema Público de Incorporação, Diagnóstico e Retenção), a rede de saúde foi alertada, mediante capacitações, quanto aos principais fatores de risco, sinais e sintomas relacionados ao HIV.

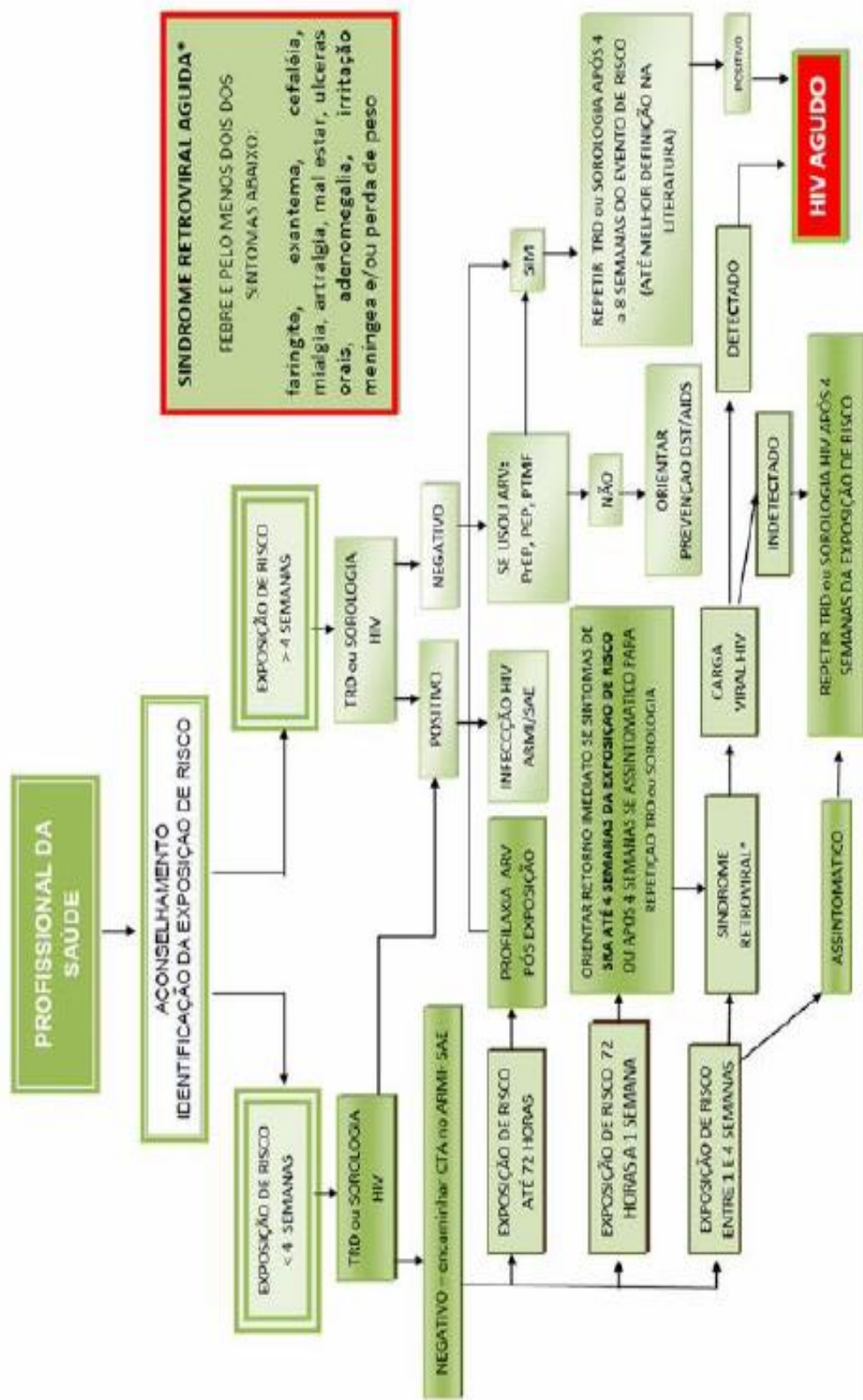
No período do estudo, de outubro de 2011 a novembro de 2014, foram encaminhados ao Ambulatório de Referência em Moléstias Infecciosas do Programa de DST/AIDS do Município de Santo André, pacientes recém-diagnosticados com infecção pelo HIV, provenientes da rede de Saúde do Município, inclusive dos Centros de Testagem e Aconselhamento, e pacientes com suspeita de infecção aguda pelo HIV identificados por profissionais a região.

Por limitações logísticas, o estudo foi oferecido apenas a parte dos pacientes que compareceram ao SAE/CTA. Esses foram convidados a participar deste estudo pelo pesquisador principal ou um dos profissionais do serviço de forma aleatória.

Estima-se que cerca de trezentos pacientes tenham sido admitidos neste período no SAE. Cento e dois pacientes tiveram suas amostras estudadas, destes, três casos suspeitos de agudo, não confirmados, foram excluídos, noventa e nove pacientes infectados pelo HIV foram incluídos e denominados de **Grupo DR – DIAGNÓSTICO RECENTE**.

A partir dos dados disponíveis no SISCEL, SICLOM e SINAN foram analisadas as características de 155 adicionais pacientes admitidos no serviço no período do estudo, estes foram denominados **Grupo ARMI – AMBULATÓRIO DE REFERÊNCIA EM MOLÉSTIAS INFECCIOSAS**, conforme anteriormente explicado na metodologia (figura 03).

As características dos pacientes DR e ARMI estão resumidas na tabela 1. O algoritmo utilizado está descrito abaixo, na figura 4.



**Figura 4:** Fluxograma de Diagnóstico de Infecção recente pelo HIV-1  
 Fluxo SPIDER - Sistema Público de Incorporação, Diagnóstico e Retenção-



**Tabela 1:** Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais na admissão dos pacientes

Características	DR	ARMI	TODOS	Valor <i>p</i>
Número de indivíduos	99	155	254	
Idade	29,6 ( 23,4 -36,9)	35,2 (26,9-45,2)	33 (25,5-41,9)	
Mediana de Carga viral em Log <sub>10</sub> /mL	4,61(4,02 - 5,11)	4,52 (3,85-5,12)	4,5 (3,9-5,1)	
Mediana de células CD4 em céls/mm <sup>3</sup>	466 (326-703)	332 (156-556)	397 (213,5-611)	0,0011**
CD4 abaixo de 200 céls/ mm <sup>3</sup>	14 (14,1%)	44 (28,8%)	58 (23%)	0,013***
Sexo masculino (%)	83/99 (83,8%)	122/155 (78,7%)	205 /254 (80,07%)	
HSH (%)	70/83 (84,3%)	67/122 (54,9%)	137/205 (66,82%)	0,001****
Heterossexual masculino (%)	12/83 (14,5%)	48/122 (39,34%)	45/205 (21,95%)	
Uso de drogas injetáveis (%)	1 (1,2%)	0	1/205 (0,49%)	
Indeterminado masculino (%)	0	9/122 (7,37%)	7/205 (3,41%)	
Sexo feminino (%)	16/99 (16,2%)	33/155 (21,29%)	49/254 (19,29%)	
Heterossexual feminino (%)	14/16 ( 87,5%)	31/33 (93,93%)	45/49 (91,84%)	
Indeterminado feminino (%)	2*/16 (12,5%)	2/33 (6,06%)	4/49 (8,16%)	
Tuberculose	3(3%)	18 (11,6%)	24 (8,26%)	0,029***
Casos de Óbito	2 (2,02%)	6 (3,87%)	8 (3,15%)	0,48*****
Data do primeiro exame HIV+	ago13 (jan13-jan14)	fev 13 (jun 12-jan 14)		

Estão descritos como número de casos/total de casos e percentagem (%) ou como mediana e percentil (25th-75th). \*Um dos casos listado como indeterminado feminino no Grupo DR está descrito como uma possível transmissão associada a procedimento de manicure no anexo 6 (Matsuda, 2014b). DR- Grupo DR; ARMI- Grupo ARMI; ARV- antirretroviral; HSH- homem que faz sexo com homem. \*\*- *Mann-Whitney* \*\*\*- *Yates-corrected* \*\*\*\*- *Yates-corrected* incluindo os casos indeterminados como HSH \*\*\*\*\* - *Fisher exact*.

Na admissão no SAE a mediana de células CD4 foi menor no Grupo ARMI ( $p=0,0011$  *Mann-Whitney*). Em 14 (14,1%) dos pacientes do Grupo DR na admissão o CD4 foi menor que 200 céls/mm<sup>3</sup>, contra 44 (28,8%) do Grupo ARMI ( $p=0,013$  *Yates corrected*). Entre todos os pacientes admitidos no período em 58 (23%) apresentaram CD4 menor que 200 na admissão.

Na investigação dos óbitos, foi possível acessar o prontuário de 5/6 casos do Grupo ARMI, em três o óbito foi por quadro pulmonar associado a AIDS, com um caso por insuficiência renal aguda e outro por pancreatite aguda associada a infecção abdominal em paciente sob tratamento de tuberculose pulmonar por 1 mês. Em todos os 5 casos os pacientes foram diagnosticados, com doença avançada e faleceram sem iniciar ARV. O caso na qual o prontuário não foi encontrado o óbito ocorreu 3 meses após a introdução de ARV, seguido de abandono de acompanhamento. No Grupo DR houve 2 óbitos, em um caso o prontuário não foi encontrado. Este faleceu após 2 meses do diagnóstico, sendo que com um mês do diagnóstico tinha CD4 de 392 céls/mm<sup>3</sup> e 5,7 log<sub>10</sub> de viremia, vindo a falecer sem iniciar ARV. No outro caso o paciente estava privado de liberdade, diagnosticado HIV na admissão em clínica de hemodiálise. Tratado, apresentou carga viral não detectada e CD4 de 503 céls/mm<sup>3</sup> no mês do óbito, 1 ano após o diagnóstico, sem maiores detalhes sobre a causa do óbito.

#### 4.1. Descrição do Grupo Diagnóstico Recente (DR)

Os pacientes do Grupo DR foram estratificados em 3 grupos segundo o tempo de infecção estimado, baseado nas datas do exame anterior negativo e positivo (soroconversão), e/ou com base em dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, como início de vida sexual e apresentação na admissão de infecção aguda. **CDC Zero** foi considerado nos pacientes compatíveis com a classificação proposta pelo CDC em 2014, ou seja, com provável infecção há no máximo 6 meses. **Recente** aqueles

com provável infecção entre 6 e 24 meses. **Crônicos ou indefinidos** foram estratificados os pacientes onde não foi possível a identificação do período de ocorrência do contágio ou se este ocorreu há mais de 2 anos. Em decorrência das limitações de informações em alguns casos, alguns pacientes podem não estar na estratificação correta pela ausência de informações precisas.

Na admissão no serviço 81 (81,81%) encontravam-se clinicamente assintomáticos, 13 (13,13%) com sintomas de AIDS ou relacionados a AIDS e 5 (5,05%) com sintomas compatíveis com Síndrome Retroviral Aguda e evidências laboratoriais de infecção aguda. Entre os pacientes assintomáticos um caso adicional foi classificado como agudo, com soroconversão documentada de 23 dias, porém sem carga viral detectada, possivelmente por tratar-se de um controlador de elite (descrito no anexo 5). Dois casos com tempo médio entre o último teste sorológico negativo e o primeiro positivo maior que 6 meses foram considerados *CDC Zero* devido a: i) um apresentar sintomas compatíveis com Síndrome Retroviral Aguda e carga viral de 6,52 log<sub>10</sub>; ii) outro por ter no diagnóstico do HIV parceiro fixo há 2 anos, testado HIV negativo e uma única exposição sem proteção a outro parceiro, seguido de sintomas de síndrome retroviral aguda após 3 semanas do evento, sendo este anterior ao diagnóstico em 4 meses.

Quando os 99 pacientes foram questionados quanto a sintomas em até 6 meses, 74 (74,74%) negavam sintomas, 12 (12,12%) relataram sintomas compatíveis com síndrome retroviral aguda e os mesmos 13 (13,13%) que referiram sintomas de AIDS ou relacionados a AIDS na admissão, referiram estes sintomas anteriores a admissão e em até 6 meses.

#### **4.1.1. Subtipo viral**

O subtipo viral na polimerase foi avaliado em 90 casos, o subtipo mais frequente foi o B, observado em 67 (74,44%) casos, seguido de C em 7 (7,8%), BF em 6 (6,7%), CB em 5 (5,6%) e F em 3 (3,3%). Deste modo,

13% (12/90 IC 7,4-21,6) o subtipo C foi encontrado em pelo menos em parte do genoma viral. Em dois casos o subtipo não pode ser claramente determinado.

#### **4.1.2. Realização anterior de exame Anti-HIV**

Dos 99 pacientes incluídos no Grupo DR, 60 (60,6%) tinham antecedente de terem feito exame de HIV anteriormente com resultado não reagente. A mediana de tempo entre o exame negativo anterior e o positivo foi de 12,85 (6,06-26,1) meses, com 70% dos casos com último exame negativo realizado em menos de 24 meses. A mediana de tempo entre o exame negativo e a amostra estudada, quanto a ambiguidade viral, genotipagem e avidéz foi de 15,83 (8-30,77) meses.

#### **4.1.3. Teste de avidéz**

Entre os 99 pacientes do Grupo DR, o teste de avidéz foi realizado em 96 (97%) amostras. Foi considerado incidente em 32 (33,3%), prevalente em 62 (64,6%), com 2 inconclusivos (2,1%).

A tabela 2 resume as principais características do Grupo DR.

**Tabela 2:** Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, segundo o tempo de infecção no Grupo DR.

<b>Características</b>	<b>CDC Zero</b>	<b>Recente</b>	<b>Crônicos/Indefinidos</b>
Total de indivíduos 99 (100 %)	15 (15,15%)	27 (27,27%)	57 (57,57%)
Sexo masculino (%)	11 (73,3%)	25 (92,6%)	47 (82,5%)
Idade	27 (21,9-32,8)	24,9 (22,3-31,4)	31,2 (25,4-40,1)
Risco HSH (%)	11 (73,3%)	25 (92,2%)	34 (59,6%)
<b>SUBTIPO (%)</b>			
B	10 (71,4%)	19 (76%)	38 (74,5%)
C	3 (21,4%)	1 (4%)	3 (5,9%)
BF	1 (7,1%)	2 (8%)	3 (5,9%)
BC	0	2 (8%)	3 (5,9%)
F	0	1 (4%)	2 (3,9%)
ambPOL	(14/15) 0,135 (0,00-0,2)	(25/27) 0,18 (0,00-0,63)	(50/56) 0,45 (0,18-0,82)
Teste de avidéz Incidente	10/15 (66,7%)	8/26 (30,76%)	14/55 (25,5%)
Teste de avidéz Prevalente	3/15 (20%)	18/26 (69,2%)	41/55 (74,5%)
Mediana de células CD4 em céls/mm <sup>3</sup> na admissão	568 (322-607)	468 (373-655)	434 (254-717)
Mediana de Carga viral em Log <sub>10</sub> /mL na admissão	4,82 (3,89-5,7)	4,24 (3,84-5,09)	4,67 (4,21-5,05)

Tempo de infecção estimado com base na data da soroconversão e dados clínico- epidemiológicos, estratificados como: CDC Zero (infecção <6meses), Recente (infecção de 6 meses a 2 anos) e Crônicos/Indefinidos (infecção >2anos ou indefinida). A tabela inclui o número de casos, número de casos/total de casos e percentagem (%) ou como mediana e percentil (25th-75th). HSH- homens que fazem sexo com homens; ambPOL: índice de ambiguidade na polimerase.

#### **4.1.4. Avaliação de mutações de resistência no Grupo DR**

##### **4.1.4.1. Estadiamento dos pacientes DR na admissão e segundo presença de mutações de resistência**

Em 90 dos 99 pacientes foi possível obter o sequenciamento genético da região polimerase para avaliação de subtipo e mutações de resistência. Em 75/90 (83,3%) pacientes nenhuma mutação de resistência foi encontrada. Em 15/90 (16,66%) casos alguma evidência de resistência foi observada: em 6/90 (6,66% IC 2,7-13,4) foram encontradas mutações de resistência pertencentes a lista CPR, mutações consideradas como TDRM pela *WHO* (Wensing et al., 2014), descritas e analisadas no *Stanford Calibrated Population Resistance Criteria* (CPR), incluindo mutações para análogos (1/6), para não análogos (4/6) e para inibidor de protease (1/6); em outros 9 pacientes foram encontradas mutações de resistência que não estão no CPR, contudo, fazem parte da lista de resistência do *Stanford HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm Version 7.0* (last updated 02/27/14)

O estadiamento dos pacientes segundo o CDC 1993 e 2014, de acordo com a presença ou ausência de mutações de resistência estão sumarizadas na tabela 3.

**Tabela 3:** Estadiamento dos pacientes segundo as classificações do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention-CDC*) 1993 e 2014 e de acordo mutações de resistência.

Total de pacientes DR com genotipagem	Ausência MR	MR	Grupo DR
90 (100%)	75 (83,3%)	15 (16,6%)	99
Estadiamento CDC1993			
A1	38	4 (2)*	46/99 (46,46%)
A2	25	6 (2)*	35/99 (35,35%)
A3	4	1	5/99 (5,05%)
B2	2	0	2/99 (2,02%)
B3	4	3 (2)*	8/99 (8,08%)
C1	1	0	1/99 (1%)
C2	1	0	1/99 (1%)
C3	0	1	1/99 (1%)
Estadiamento CDC 2014			
0	10	4 (2)*	15/99 (15,15%)
1	33	2 (1)*	38/99 (38,38%)
2	24	4 (1)*	32/99 (32,32%)
3	8	5 (2)*	14/99 (14,14%)

A tabela inclui o número de casos, número de casos/total de casos e percentagem (%). \*- Número de indivíduos com presença de mutação da lista de Resistência de *Stanford (Stanford Calibrated Population Resistance Criteria -CPR)*; MR-Mutação de Resistência; DR- Grupo Diagnóstico Recente

#### 4.1.4.2. Detalhamento dos casos com mutação de resistência

Os 15 casos com mutação de resistência estão descritos na tabela 4 e publicados como parte de uma avaliação multicêntrica de sítios do Estado de São Paulo (anexo 4; Guimarães, et al., 2015). O caso 86413, com resistência transmitida evoluiu rapidamente com novas mutações de resistência, na segunda genotipagem colhida com 49 dias de intervalo da primeira e encontra-se no anexo 5 como: Descrição de caso: Caso de resistência transmitida com rápida evolução de resistência ao Tenofovir.

As mutações K103\*, P225H\*, L210W\*, T215S\* e M46I\*, presentes em seis pacientes, estão na lista CPR de mutações consideradas como de

resistência pela WHO (Wensing et al 2014), descritas e analisadas no *Stanford Calibrated Population Resistance Criteria (CPR)*.

**Tabela 4:** Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos casos com mutações associadas a resistência antirretroviral.

CASO	SEXO	IDADE	RISCO	2014 CDC	1993 CDC	CLÍNICAadm	CD4	CV	SUBTIPO	PR	RT
5414	MASC	35	HSH	2	A2	ASY	458	5,30	B		<b>E138A</b>
18514	MASC	28	HSH	2	A2	ASY	356	4,95	B		<b>E138A, V90I</b>
86413	MASC	52	HSH	3	B3	SIN	44	6,48	B	L10I	<b>V179D, V90IV</b>
83513	MASC	24	HSM	2	A2	ASY	326	4,60	B		<b>K103N*</b>
25713	MASC	39	HSH	2	A2	ASY	399	3,80	B	A71T	<b>E138A</b>
153414	FEM	47	MSH	0	A2	ASY	396	5,11	C		<b>K103N*</b>
57413	MASC	23	HSH	1	A1	ASY	627	3,50	B		<b>E138A</b>
7013	MASC	21	HSH	1	A1	ASY	967	5,21	B		<b>K103N*, P225H*</b>
62714	MASC	30	HSH	3	C3	SIN	7	4,67	BF		<b>V179D</b>
55414	MASC	18	HSH	0	A1	ASY	875	3,64	C	<b>T74S</b>	<b>L210LW*</b>
78813	MASC	39	HSM	3	B3	SIN	40	5,75	B	A71T	<b>E138A</b>
64814	MASC	37	HSH	0	A2	SRA	322	6,52	B	L10I	<b>E138A</b>
39514	FEM	56	MSH	3	B3	SIN	182	5,48	B	<b>M46I*<sup>MV</sup> L33I</b>	
35414	MASC	33	HSH	3	A3	ASY	92	5,34	B	L10I	<b>T69N</b>
55612	MASC	19	HSH	0	A1	ASY	570	4,82	B		<b>T215S*</b>

2014 CDC- estadiamento segundo Centro de Prevenção e Controle de Doenças, revisão de 2014; 1993 CDC- estadiamento segundo Centro de Prevenção e Controle de Doenças. CLÍNICAadm- clínica na admissão; ASY-assintomático; SIN-sintomático (sintomas relacionados a AIDS ou AIDS); SRA-síndrome retroviral aguda. CD4- contagem de células CD4 em células/mm<sup>3</sup>; CV- carga viral em log<sub>10</sub>; PR- protease; RT-transcriptase reversa; MASC - masculino; FEM- feminino; HSH-homem que faz sexo com homem; MSH- mulher que faz sexo com homem; A presença das mutações A71T, L33I ou L10I, V90IV, isoladamente, não conferem diminuição de susceptibilidade para nenhum ARV em uso clínico. K103\*, P225H\*, L210W\*, T215S\* e M46I\*, presentes em seis pacientes, estão na lista de mutações consideradas como de resistência pela WHO (Wensing et al 2014), descritas e analisadas no *Stanford Calibrated Population Resistance Criteria (CPR)*.

O anexo 7 faz considerações sobre as mutações de resistência com impacto clínico, descritas na tabela 4, segundo o algoritmo de análise de resistência de *Stanford (Stanford HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm – GRI, Version 7.0, last updated 02/27/14)*.



#### 4.1.5. Descrição dos casos agudos: com menos de 6 meses de soroconversão e síndrome retroviral aguda na admissão (CDC 2014 categoria Zero)

Entre os 99 pacientes admitidos pelo fluxograma *SPIDER*, que contemplava o diagnóstico de pacientes agudos, cinco pacientes foram identificados e caracterizados clínico (SRA), epidemiológico e por técnicas laboratoriais como pacientes recém-infectados, no *estágio* menor que 4 (Cohen, 2011a).

O tempo do início dos sintomas variou de 3 a 16 dias, os principais sinais e sintomas verificados foram: febre 5/5, cefaleia 4/5, exantema 4/5, faringite 3/5, adenomegalia cervical 4/5, mialgia 2/5, leucopenia 1/5 e diarreia 1/5. Nestes 5 pacientes o teste de avidéz resultou incidente em 4 e inconclusivo em 1.

A tabela 5 resume os dados clínicos, laboratoriais e estadiamento dos pacientes agudos com Síndrome Retroviral Aguda segundo as classificações do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC, 1993; CDC, 2014).

**Tabela 5:** Dados clínicos, laboratoriais e estadiamento dos cinco pacientes agudos com Síndrome Retroviral Aguda na admissão

Características	Síndrome Retroviral Aguda
Total de indivíduos (%)	(5/99) (5,0%)
Sexo masculino (%)	(4/5) (80%)
Idade	27 (22,6-32,8)
Risco HSH (%)	(4/5) (80%)
SUBTIPO B (%)	(5/5) (100%)
AmbPOL	0,00 (0,00-0,09)
Mediana de células CD4 em céls/mm <sup>3</sup> na admissão	322 (244-571)
Mediana de carga viral em Log <sub>10</sub> /mL na admissão	6,33 (5,7-6,52)
Estadiamento CDC1993	
A1	(2/5) (40%)
A2	(2/5) (40%)
A3	(1/5) (20%)
Estadiamento CDC 2014: 0	(5/5) (100%)

Segundo as classificações do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention-CDC*) 1993 e 2014. A tabela mostra o número de casos/total de casos e percentagem (%) ou como mediana e percentil (25th-75th). HSH- homens que fazem sexo com homens; ambPOL: índice de ambiguidade na polimerase.

## 5. Discussão

Em declaração na abertura do 35º Encontro da UNAIDS em dezembro de 2014, o seu diretor executivo Michel Sidibé declara que temos apenas cinco anos para quebrar a trajetória da epidemia de AIDS, diagnosticando e garantindo o acesso a um tratamento eficaz para todas as pessoas que necessitam, através de uma estratégia denominada em inglês de *Fast-Track*. Estas metas foram lançadas na Assembleia Geral das Nações Unidas em setembro de 2014, onde em 2020, 90% de todas as pessoas que vivem com HIV irão saber o seu estado sorológico, 90% de todas as pessoas diagnosticadas com HIV receberão tratamento e 90% das pessoas em tratamento irão atingir uma supressão viral. Estas metas de prevenção incluem a redução do número anual de novas infecções pelo HIV em mais de 75%, para 500.000 em 2020 e para 200.000 em 2030, pondo fim a epidemia (UNAIDS, 2014).

O teste do HIV é a porta de entrada para a prevenção, tratamento, cuidados e outros serviços de apoio. O conhecimento das pessoas de seu estado do HIV, através dos centros de testagem é crucial para o sucesso da resposta ao HIV. O Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) e da Organização Mundial da Saúde aprovaram metas globais para alcançar "zero, novas infecções por HIV, zero discriminação e zero mortes relacionadas com a AIDS". Por causa das potenciais consequências médicas, sociais e psicológicas graves de erros de diagnóstico do HIV (ou falso-positivos ou falso-negativos), todos os programas devem se esforçar também para atingir metas de zero de diagnósticos equivocados (WHO, 2015).

O primeiro 90 (diagnóstico de HIV) é essencial para o segundo 90 (início do TARV das PVHA), e para o resultado final do terceiro 90 (supressão da carga viral entre as pessoas em TARV), o que beneficia o paciente e impede a transmissão do HIV-1 (Cohen et al., 2011b; WHO, 2015).

A estratégia do tratamento como prevenção (TasP do Inglês, *Treatment as Prevention*) adotada pelo Programa Nacional de DST/AIDS em

dezembro de 2013, recomenda o início imediato da TARV para todas as PVHA, independentemente da contagem de CD4, considerando a motivação do paciente (Brasil, 2013), e como dito anteriormente (o primeiro 90) depende da capacidade de se diagnosticar novos casos.

Zhang e colaboradores sugeriram que os indivíduos não mantêm um mesmo grau de exposição de risco ao longo da vida. Passam a ter episódios de comportamento de risco, se infectam e durante este curto período de alta transmissibilidade, mantêm uma fase de alta taxa de relacionamentos, contribuindo no aumento da prevalência e como consequência a estratégia TasP poderia ser menos efetiva (Zhang et al., 2012). Essa situação se alia ao fato de que a alta carga viral e a homogeneidade das variantes virais nos pacientes agudos podem incrementar a transmissão (Cohen et al., 2011a).

Embora a contribuição da fase aguda da doença, não seja tão impactante em ambientes epidemiológicos estabelecidos, como a África subsaariana (Bellan et al., 2015), essa fase deve representar um papel mais determinante em cenários de epidemia concentrada, em indivíduos em situação de maior risco e vulnerabilidade, pois estas apresentam maiores prevalências de infecção pelo HIV quando comparadas à população geral. Esse é o caso do Brasil, onde estudos realizados em 10 municípios brasileiros entre 2008 e 2009 estimaram taxas de prevalência de HIV de 5,9% entre usuários de drogas, de 10,5% entre HSH e de 4,9% entre mulheres profissionais do sexo, contrastando com estimativas de menos de 1% para a população geral (Boletim Epidemiológico, 2013).

Nosso estudo objetivou aumentar o diagnóstico do HIV, através da implantação em serviços do SUS da cidade de Santo André, de um algoritmo que permitisse a identificação e encaminhamento adequado de casos recentemente diagnosticados de infecção pelo HIV, assim como promover a incorporação ao SUS de casos suspeitos de infecção aguda, que não são facilmente identificados, apesar de estarem em um período de grande infectividade.

O algoritmo permitiu ainda orientar a rede da saúde na indicação de profilaxia pós exposição ao HIV dos casos: i) com relação sexual

desprotegida, consentida ou não, há menos de 72 horas, identificados durante o aconselhamento; ii) de acidente com material biológico com paciente fonte TRD negativo, mas com exposição de risco, dentro do período de janela imunológica, com possibilidade de resultado falso negativo (Brasil, 2015). Nesta última situação a profilaxia deve ser indicada e mantida até que a infecção aguda seja descartada no paciente fonte. E mesmo naqueles com exame de anticorpos positivo contra o HIV, o algoritmo possibilitou a suspeita da infecção recente, a partir da identificação dos sintomas compatíveis com a síndrome retroviral aguda, favorecendo o entendimento da dinâmica epidêmica e permitindo a TARV precoce, com benefícios ao paciente e a comunidade.

A infecção aguda é definida como o período imediatamente após a aquisição da infecção e a detecção de anticorpos. A infecção recente compreende a infecção aguda e os seis primeiros meses após a aquisição da infecção (DHHS, 2015). Porém, alguns estudos consideram a infecção como recente se a soroconversão ocorreu em até 12 meses (Sierra-Enguita et al., 2014).

Apesar da importância para a saúde pública da infecção aguda, sintomática em vários pacientes, esta síndrome raramente é reconhecida (Kelley et al., 2007), em parte pelas limitações diagnósticas nessa fase caracterizada pela conversão sorológica (Cohen et al. 2011a), assim como por serem os sintomas inespecíficos e muitas vezes não demandarem atendimento médico, e quando demandam a infecção aguda pelo HIV não é suspeitada. Esta pode se apresentar como uma síndrome semelhante à mononucleose, inespecífica, ocorrendo cerca de 1 a 6 semanas após a infecção, representando uma fase altamente infecciosa associada a cargas virais extremamente altas (Pilcher et al., 2001).

Kessler e colaboradores em 1987 já relatavam a dificuldade de diagnosticar e suspeitar de HIV agudo em uma série de quatro pacientes homossexuais soronegativos que se apresentavam com uma síndrome viral aguda, testados positivos em teste de imunoenensaio enzimático para antígeno de HIV (HIV-Ag) no soro. A síndrome clínica nestes quatro pacientes foi

caracterizada por febre (quatro), erupção cutânea (três), mialgias-artralgias (três), e faringite (dois). Todos os pacientes tiveram resolução espontânea de seus sintomas dentro de oito a doze dias. Os anticorpos séricos do HIV foram testados por elisaimunoensaio disponível comercialmente e por análise de *Western blot*, o resultado foi negativo em todos os pacientes no momento da síndrome viral aguda, com soroconversão de todos os testes subsequentes (Kessler et al., 1987).

No nosso estudo foram incluídos 99 pacientes recém diagnosticados, sendo que cinco pacientes apresentavam quadro clínico na admissão compatível com SRA. Em dois destes a investigação inicial incluiu sorologia para síndrome da mononucleose e dengue. Em três dos cinco com SRA o TRD foi negativo, na avaliação com o especialista infectologista, sendo que se encontravam sintomáticos há 4, 7 e 18 dias. Um destes três havia feito TRD negativo no pronto socorro onde permaneceu em observação por leucopenia febril e teve seu exame repetido ao ser avaliado pelo infectologista e novamente o TRD foi negativo. Deste modo, o algoritmo permitiu a suspeita da infecção aguda pelo HIV, diante de exame negativo (TRD), baseado na sintomatologia apresentada e na identificação da exposição de risco, posteriormente confirmada pelo exame de carga viral. Nos outros dois casos a sorologia realizada, estava indeterminada em um e positiva no outro, em pacientes com sintomatologia há 5 e 9 dias, respectivamente. Este positivo foi um paciente com uma meningite viral, onde a suspeita de infecção pelo HIV foi feita antes da avaliação do especialista infectologista, e talvez somente tenha sido diagnosticado devido a sorologia já estar positiva. Vale ressaltar que apesar do pequeno número de casos diagnosticados, estes são relevantes diante das dificuldades de se suspeitar e diagnosticar a infecção aguda. Um paciente adicional pode ser caracterizado como agudo, pela documentação da conversão sorológica em 23 dias, estava assintomático e nunca teve viremia detectada, por tratar-se possivelmente de um controlador de elite. Entre estes seis casos agudos, 5 eram do sexo masculinos e todos os 5 HSH.

Os cinco casos de SRA confirmados como infecção aguda pelo HIV, foram identificados a partir de 8 casos suspeitos (62,8%).

Alguns estudos tentam estimar a proporção de novas infecções decorrentes de casos agudos ou recentemente infectados, com estimativas que na fase inicial da epidemia, até 80% das transmissões ocorreram a partir de pessoas na fase aguda. Com a disseminação da epidemia na população houve diminuição dessa proporção para cerca de 50%. (Cohen et al., 2011a; Powers et al., 2010).

Estimativas de incidência são necessárias para monitorar a resposta contra a epidemia de HIV/AIDS (Cousins et al., 2014).

Em nosso estudo procuramos classificar os pacientes de acordo com a data entre o exame anterior do HIV negativo e o positivo do diagnóstico, em: i) *CDC Zero (infecção recente, incluindo casos agudos)*: 15 casos; ii) *recente (6 meses a 2 anos)*: 27 casos e iii) *crônicos/indefinidos* (sem documentação de exame negativo anterior, ou positividade ocorrida após mais de 2 anos do exame anterior negativo): 57 casos. Deste modo, é possível que alguns pacientes classificados como *recentes* possam ser casos *CDC Zero*, assim como alguns dos casos classificados como *crônicos/indefinidos* possam ser casos *recentes* ou até mesmo *CDC Zero*, casos onde os critérios para classificação não foram identificados.

Na tentativa de identificar os casos incidentes os pacientes tiveram suas amostras avaliadas por métodos sorológicos (teste de avidéz) e por medidas de variabilidade viral (índice de ambiguidade).

Entre os 99 pacientes do Grupo DR, o teste de avidéz foi realizado em 96 (97%) amostras. Entre os classificados como crônicos/indefinidos, o resultado foi incidente em 14/55 (25,5%), ou seja, poderiam tratar-se de casos com menos de 8 meses de infecção (CDC zero ou recente). Entre todos os 96 testados a infecção foi considerada incidente em 32 (33,3%), logo poderiam se tratar de pacientes recém infectados.

Os testes sorológicos isoladamente têm um poder preditivo individual baixo, sendo proposto o seu uso dentro de algoritmos que incluem outros biomarcadores não sorológicos como a contagem de células CD4, carga

viral e medidas de variabilidade viral. Esta última tem sido sugerida por alguns pesquisadores para estimar a incidência do HIV (por exemplo, pela quantificação da proporção de posições de bases ambíguas ou mistas em dados de sequenciamento *Sanger* ou usando métodos computacionais para quantificar a diversidade do HIV usando dados de sequenciamento de próxima geração). Esta abordagem baseia-se na premissa de que a diversidade do HIV tende a aumentar ao longo do tempo após a infecção (Cousins et al., 2014).

A ambiguidade viral encontrada na polimerase entre os 90 pacientes, onde foi possível esta análise, teve significância estatística quando comparamos *CDC Zero* 0,135% (0,00-0,2) ou *recente* 0,18% (0,00-0,63) em relação aos *crônicos/indefinidos* 0,45% (0,18-0,82) (*Kruskal-Wallis*  $p = 0,0003$ ). Porém há limitações potenciais do uso destes dados de diversidade baseada na sequência isoladamente para estimar a incidência do HIV. Andersson e colaboradores analisaram a ambiguidade de 691 sequências de indivíduos recém-infectados ( $\leq 1$  ano) e cronicamente infectadas ( $> 1$  ano) da Suécia, Vietnã e Etiópia, com sequenciamento de parte do gene *pol* do HIV. Uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na proporção de bases ambíguas foi observada entre as sequências a partir de indivíduos com infecção recente e crônica, tanto em HIV-1 do subtipo B e não-B. Utilizando o valor de corte de 0,47% para identificação de infecção recente, o índice de ambiguidade mostrou sensibilidade e especificidade de 88,8% e 74,6%, respectivamente (Andersson et al., 2013).

Se usarmos este mesmo valor de corte de 0,47%, proposto por Andersson e col. no nosso estudo, 58 (64,4%) seriam incidentes (menos de 1 ano de infecção) pela ambiguidade contra 32 (33,3%) casos incidentes (menos de 239 dias de infecção) no teste de avidéz. Há uma janela de 4 meses entre as metodologias, permitindo que mais casos possam ser incidentes pela ambiguidade

Quando avaliamos a data do exame de HIV realizado anteriormente negativo, este foi realizado em 60 (60,6%) pacientes. A mediana de tempo, em meses entre o exame negativo anterior e a amostra na qual foi avaliada

tanto a ambiguidade viral, como o teste de avidéz, foi de 15,83 meses (8-30,77), este seria o tempo máximo estimado entre a infecção pelo HIV e a amostra estudada. Esta estimativa de data, parece ser um critério mais sólido, que poderia servir de referência para avaliarmos os resultados da ambiguidade viral e do teste de avidéz. Se considerarmos o corte de 0,47% na ambiguidade proposto por Andersson e col., seriam incidentes com menos de 1 ano de infecção 64,4% (58/90).

Além do uso desses parâmetros para estimar a incidência em uma população, a identificação do caso agudo/recente pode ter importância prática. Em modelos com vírus da imunodeficiência símio (SIV) em macacos *rhesus*, foi demonstrado que o plasma de animais com infecção aguda foi mais de 750 vezes mais infectante do que de macacos com infecção crônica (Ma et al., 2009). Essa observação, embora não tenha sido avaliada em humanos, sugere que não apenas a quantidade do vírus, maior na fase aguda, mas também o número de eventos de risco, e características ainda indeterminadas do próprio vírus contribuem para a alta transmissibilidade nessa fase.

Essas características colocam a fase aguda como uma das fases onde a transmissibilidade parece mais importante. Mesmo considerando o curto período de tempo dessa fase, semanas, em relação ao longo período de latência clínica, anos (Cohen et al., 2011a).

Identificar os casos de infecção recente, sobretudo de infecção aguda deveria ser prioridade, principalmente em gestantes e mulheres amamentando, onde a prevalência da infecção pelo HIV é maior do que nas mulheres fora dessa fase, somado as evidências que a transmissão do HIV intra-útero e durante o aleitamento pode ser maior entre as mulheres que apresentam soroconversão (Marinda et al., 2011; Drake et al., 2014). Portanto, a aquisição do HIV não é incomum em mulheres grávidas, o que provavelmente aumenta o risco de transmissão vertical (Cohen et al., 2010).

Entre mulheres que soroconverteram no pós-parto, com tempo de infecção pelo HIV conhecida menor de 90 dias, calculado com base no tempo entre o primeiro exame negativo e o primeiro exame positivo, se



estimou que o risco de transmissão pelo aleitamento nos três primeiros meses após a infecção materna seria 4,6 vezes maior do que em mães com infecção crônica (Humphrey, 2010).

Este cenário de risco de transmissão vertical por infecção aguda, pôde ser visto no nosso estudo, onde a única mulher entre os 6 casos agudos, amamentava um lactente de cinco meses com uma carga viral acima do limite de detecção de 750.000 cópias/mL. Apesar de sintomática há cerca de 3 semanas e com várias passagens por serviços de saúde, não teve a infecção aguda suspeitada até a avaliação do especialista infectologista. Seu parceiro nunca fora testado. Deste modo, o algoritmo proposto permitiu o reconhecimento da infecção aguda materna, suspensão do aleitamento em definitivo e a introdução de TARV profilática para o lactente e terapêutica para a mãe. Esta intervenção provavelmente contribuiu para garantir a não transmissão vertical nesse caso, além do benefício à mãe que foi tratada precocemente (anexo 5) (Matsuda et al., 2013).

Kinuthia e col. encontraram numa coorte prospectiva de estudo sobre a aquisição do HIV-1 durante a gravidez e no período pós-parto, vinte e cinco infecções adquiridas neste período, e nenhuma destas mulheres referiu ter um parceiro positivo (Kinuthia et al., 2015). Deste modo, identificar o parceiro sorodiscordante é um desafio para a eliminação da infecção perinatal (Neisheim et al., 2013).

No Brasil tem se buscado identificar a infecção pelo HIV em gestantes, que são testadas no decorrer da gravidez e na hora do parto. Parceiros são convocados para testagem, na sua grande maioria, em uma única ocasião durante a gravidez, no denominado pré-natal do homem, como parte das ações da “Rede Cegonha” que promove a ampliação da detecção precoce e tratamento do HIV e da sífilis em gestantes, iniciativa lançada pelo Governo Federal em 2011 (Brasil, 2014a). A detecção de gestantes infectadas ainda é muito deficiente, pois segundo a estimativa de prevalência de HIV em parturientes, o número esperado de gestantes com HIV no Brasil é de aproximadamente 12 mil casos por ano. Em 2012, apenas

55% dos casos esperados foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (Brasil, 2014b).

A repetição da testagem do HIV durante a gravidez permite a identificação da infecção aguda, nos casos onde há um teste positivo, precedido por um teste recente negativo, porém em casos mais recentemente infectados, no período de janela imunológica do teste rápido, a infecção aguda pode não ser identificada antes do parto e durante o aleitamento.

Testar o HIV na gestação identifica a mulher infectada, a incorpora à assistência à saúde, onde será disponibilizado o TARV, com controle da viremia, que associado à profilaxia no parto, o não aleitamento e a profilaxia do recém-nascido, provavelmente prevenirão a infecção do bebê e permitirá a vinculação da mãe ao SAE. Porém, por outro lado a testagem também identifica a mulher não reagente, que pode estar em janela imunológica no momento da testagem ou exposta a infecção. Neste cenário não deveríamos ser menos atentos a mãe com teste negativo, pois esta se encontra em risco de estar agudamente infectada ou se infectar futuramente, e como descrito anteriormente, a infecção aguda com alta viremia, possibilita um maior risco de transmissão materno fetal, intra-útero, periparto ou posteriormente com a amamentação. Não é prática em nosso meio manter a testagem do HIV enquanto a mãe estiver amamentando, tampouco descartar a possibilidade de HIV agudo durante a gravidez e lactação na presença de um quadro clínico febril inespecífico.

No Brasil, utiliza-se a taxa de detecção de AIDS em menores de cinco anos de idade como indicador para monitorar a transmissão vertical do HIV; houve redução de 36% (de 5,3 para 3,4 por 100.000 habitantes), entretanto com variações regionais importantes durante o período de 2003 a 2012 (Brasil, 2014b). Entretanto se objetivamos a eliminação da transmissão vertical do HIV em nosso meio, maiores esforços devem ser feitos na identificação destas mulheres cronicamente infectadas, dos seus parceiros, assim como no reconhecimento da infecção aguda durante o período da gravidez e amamentação.

Monitorar a infecção incidente pelo HIV-1 na gravidez e no período pós-parto e identificar os fatores de risco desses casos são fundamentais para se alcançar a redução de 90% da transmissão vertical segundo a UNAIDS (Soudeyns, 2015).

A identificação da soroconversão dos anticorpos contra o HIV, em qualquer fase da gravidez, em especial no momento do parto, é um alerta sobre a possibilidade de um risco aumentado da infecção ter ocorrido durante a gravidez. Nestes casos não caberia a profilaxia do recém-nascido, pois esta seria iniciada após a exposição e infecção do feto. Deste modo, o reconhecimento da infecção aguda materna é de suma importância para adequada abordagem do recém-nascido.

Nesse cenário de soroconversão, com viremia materna desconhecida ou acima de 1000 cópias/mL, o protocolo atual do Ministério da Saúde de prevenção da transmissão vertical indica ao recém-nascido a profilaxia com zidovudina por 4 semanas e nevirapina três doses (Brasil, 2014a), sem que a infecção intra-útero seja descartada, conseqüentemente caso o recém-nascido esteja infectado não receberá terapia precoce, e sim subdose de TARV, por um curto período, sem os benefícios do tratamento efetivo precoce (Anderson et al.,2015).

No último Congresso da *Internacional Antiviral Society* (Vancouver, 2015) foi apresentado o caso de uma adolescente de 18 anos, infectada durante o parto, em supressão viral há mais de onze anos sem tratamento. Este é o primeiro exemplo que demonstra que a longo prazo, a remissão do HIV é possível após o tratamento muito precoce em crianças infectadas no período perinatal (Frange et al.,2015). Deste modo, apesar de ser apenas um caso, não devemos deixar de dar esta chance às nossas crianças, procurando oportunamente identificar aquelas sob maior risco, diagnosticar e tratar adequadamente.

Desde 2006, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomendou a realização da testagem sorológica não baseada em risco (*do Inglês, nontargeted - screening opt-out*) em todos os ambientes de cuidados de saúde, incluindo os serviços de emergência, onde a prevalência de HIV

não diagnosticado foi estimada em 0,1% ou maior (Branson et al., 2006). No Brasil essa conduta não é assumida nem nos dias de hoje, dificultando a realização do teste diagnóstico. Esse fato reforça a necessidade da criação em nosso meio, de mecanismos que aumentem o diagnóstico da infecção e a inclusão desses pacientes ao sistema de saúde.

O necessário aumento do diagnóstico envolve diferentes questões, entre estas o entendimento da população potencialmente vivendo com HIV/AIDS. Se nos basearmos nas estimativas feitas pelo Programa Nacional de DST/AIDS em 2013, teríamos uma prevalência geral de 0,4%, das quais 80% já foram diagnosticados, 73% vinculados a algum serviço de saúde e 48% em TARV (Brasil, 2014a). Com base nessas estimativas, Santo André deveria ter por volta de 2830 PVHA, 2264 destas diagnosticadas, 2066 vinculadas e 1358 em TARV. No ano de 2015 cerca de 1300 pessoas estão retirando ARV, valor este compatível com as estimativas da cascata do cuidado contínuo acima descrita, proposta pelo Programa Nacional de DST/AIDS.

Outro aspecto do nosso estudo foi poder avaliar as características dos pacientes recém diagnosticados e incorporados ao SAE, como parte do estudo (Grupo DR 99 pacientes) ou como demanda usual pelo serviço (Grupo ARMI 155 pacientes). O grupo do estudo (Grupo DR) diferiu da população geral incorporada no período ao serviço em diversos aspectos. Quando avaliamos os pacientes estudados quanto ao sexo e fator de risco atribuído a infecção, encontramos no Grupo ARMI e DR somados (254), 205 homens (80,7%) e o fator de risco HSH atribuído em 54%. Nos grupos em separado, estes apresentam uma percentagem de população masculina semelhante (Grupo ARMI 78,7% (122/155) contra Grupo DR 83,8% (83/99)  $p=0,39$  *Yates corrected*), porém o fator de risco HSH foi muito maior no Grupo DR, 70% (70/99) contra 43,22% (67/155) no Grupo ARMI ( $p=0,00003$  *Yates corrected*), mesmo se somarmos os 9 casos masculinos indeterminados do Grupo ARMI como HSH ( $p<0,001$  *Yates corrected*).

A coorte do Estudo *Start* com 4685 pacientes também recém-diagnosticados (mediana de tempo de diagnóstico de 1 ano), recrutados de

abril de 2009 a dezembro de 2013, na África, Ásia, Austrália, Europa, Israel, México, América do Norte e Sul (inclusive Brasil), 73% homens, o fator de risco HSH foi verificado em 55,2% (*INSIGHT START Study Group*, 2015). Quando comparada com todos os 254 pacientes a coorte *START* tinha menos homens (73% (3420/4685) contra 80,7% (205/254)  $p=0,0084$  *Yates corrected*) e semelhante fator de risco HSH (55,2% (2576/46850) contra 54% (137/254)  $p=0,79$  *Yates corrected*). Em comparação ao Grupo DR esta coorte tinha aparentemente um pouco menos de homens ( $p=0,02$  *Yates corrected*), porém no Grupo DR o fator de risco HSH foi significativamente mais frequente (55,2% (2576/4685) contra 70% (70/99)  $p=0,0026$  *Yates corrected*).

Vale ressaltar que esta informação sobre fator de risco no Grupo ARMI foi coletada no prontuário e no SINAN, e não investigados pessoalmente pelo pesquisador, como no Grupo DR. O fator de risco HSH foi significativamente maior no Grupo DR em comparação ao total de pacientes (Grupo ARMI e DR somados) e ao Estudo *START*, podendo sugerir, entre outros fatores, maior confiabilidade da informação do Grupo DR.

Ressalta-se que um dos casos incluídos na coorte foi apresentado na Conferência Internacional de AIDS, de Melbourne na Austrália e publicado (anexo 6) em 2014 como uma transmissão possivelmente associada à procedimento de manicure entre duas mulheres nunca descrita.

Segundo o Boletim Epidemiológico de 2013, na faixa etária de 13 anos de idade ou mais, do total de 16.464 casos de AIDS no sexo masculino notificados no SINAN no ano de 2012, 18,3% não possuem a informação da categoria de exposição. Entre os que apresentam essa informação (13.447), 32,0% são homossexuais e 9,4% bissexuais, ou seja 41,4% (5567/13.447) HSH (Boletim Epidemiológico, 2013). Em comparação com os pacientes masculinos do Grupo ARMI, 7% não tinham a transmissão determinada e 54,9% (67/122) eram HSH ( $p=0,0034$  *Yates corrected*), sendo que no Grupo DR eram 84,3% (70/83) ( $p<0,0001$  *Yates corrected*), em ambos os grupos o

valor é superior ao encontrado nos casos brasileiros de HSH em homens notificados no SINAN em 2012 (41,4%).

O Grupo DR também diferiu do grupo ARMI quanto a gravidade dos pacientes na admissão no serviço, verificado pela mediana de CD4 (466 Grupo DR contra 332 no Grupo ARMI  $p=0,0011$  Mann-Whitney) e pela porcentagem de pacientes com CD4 abaixo de 200 céls/mm<sup>3</sup> (14,1% (14/99) contra 28,8% (44/155)  $p=0,013$  Yates corrected). No Grupo DR esta abaixo do valor do Estado de São Paulo de 22% e do valor nacional de 26% (Brasil, 2014a).

Quando analisamos estes parâmetros somente em pacientes HSH, visando avaliar se a presença de mais HSH no Grupo DR influenciou estes achados, a mediana de CD4 manteve resultado mais alto no Grupo DR do que no Grupo ARMI (473,5 contra 379  $p=0,0052$  Mann Whitney), assim como a porcentagem de pacientes com CD4 abaixo de 200 céls/mm<sup>3</sup> (11,4% (8/70) contra 26,86% (18/67)  $p=0,037$  Yates corrected). Deste modo, ter mais HSH no Grupo DR não parece ter influenciado a menor gravidade neste grupo.

Tendo os pacientes do Grupo ARMI doença mais avançada, como esperado houve mais casos de coinfeção com tuberculose e óbito, este último sem significância estatística (3,87% contra 2,02%  $p=0,48$  Fischer exact). Esta frequência maior de tuberculose no Grupo ARMI em relação ao DR (11,6% contra 3%  $p=0,029$  Yates-corrected) talvez possa ser justificada, pelo fato que: i) quando os pacientes eram admitidos sintomáticos, refletiam a demanda usual e eram prontamente atendidos pelo médico que se encontrava no serviço, comprometendo a inclusão destes no grupo do estudo, apesar de não ter sido um critério de exclusão; ii) o algoritmo estimulou o diagnóstico mais precoce.

No Grupo DR foi possível realizar a análise de parte do genoma do HIV na maioria dos pacientes 90,90% (90/99), o que possibilitou pela primeira vez, avaliar as taxas de resistência transmitida (sem uso prévio de ARV) na cidade de Santo André, assim como a distribuição dos subtipos virais.

Para melhor entender o contexto geral da epidemia molecular na região, comparamos os achados da população do estudo (amostras colhidas entre outubro de 2011 e novembro de 2014), com resultados da rotina de genotipagem de pacientes do SAE de Santo André, que fizeram o exame de genotipagem no IAL no período de 2001 a 2014. Esta população de pacientes que já falharam a pelo menos um esquema antirretroviral, e, portanto, há mais tempo infectada, pode servir como um proxy da epidemia estabelecida, e permitir uma comparação com nossos pacientes. O encontro do subtipo C, pelo menos em parte do genoma viral, foi encontrado no Grupo DR em 13,33% (12/90 IC 7,4-21,6) das amostras contra apenas 1,4% (2/143 IC 0,24-4,5) dos casos da rotina ( $p=0,00046$  Yates corrected). Sendo que estes dois casos de subtipo C nas genotipagens de rotina eram masculinos, HSH, diagnosticados com infecção pelo HIV em janeiro de 2008 e fevereiro de 2012, com amostras colhidas em julho de 2013 e novembro de 2014, respectivamente. Deste modo, além da diferença significativa na proporção de C entre pacientes recém-diagnosticados do nosso estudo e os pacientes mais antigos, o subtipo C não havia sido identificado na região antes de 2012, em paciente sabidamente infectado desde 2008. Esta análise foi apresentada no Congresso Paulista de Infectologia (Matsuda et al, 2014a).

Brígido e col. descreveram a presença do subtipo C no genoma da região *pol* de indivíduos sem uso prévio de ARV em 11,6% (IC 95% 6-21) das amostras de São Paulo e em 6,8% (IC 95 4- 12%) de Campinas, no período de 2005 a 2008 (Brígido et al., 2011). Estes números são semelhantes ao que observamos nos recém diagnosticados em Santo André. No mundo o subtipo C é o mais prevalente (Brígido et al., 2011), nas Américas está presente em níveis significantes apenas nos estados do sul do Brasil, onde é responsável por 30-65% das infecções por HIV-1 (Véras et al., 2011).

Diferente do subtipo, a comparação quanto a resistência transmitida (sem exposição aos ARV) não foi possível, pois as amostras do IAL são de pacientes na qual os exames foram realizados após exposição ARV. Deste

modo, fizemos comparações com dados de outros estudos que se referem ao Brasil e a região metropolitana de São Paulo.

Stadeli e col. revisaram a literatura até novembro de 2011, 22 estudos preencheram os critérios para análise de TDRM em adultos em contextos de recursos limitados, concluiu que a prevalência de TDRM no Brasil foi de 8,4% (76/900), na África de 5,7% (233/4.069), e na Ásia de 7,6% (160/2.094), com uma taxa global de TDRM de 6,6% (469/7.063). Estimar os níveis TDRM em populações recém-infectada é especialmente importante em países de baixa e média renda para apoiar programas de prevenção e planejamento da terapia antirretroviral (Andersson et al., 2013). Nestes países, os níveis de resistência transmitidas aos medicamentos são mais baixos do que em países de alta renda, mas é provável uma mudança com o tempo (Pennings, 2013).

Entre os noventa casos do estudo na qual foi possível avaliar a resistência genotípica a um ou mais medicamento antirretrovirais, esta foi observada em 6 (6,66% IC 2,7-13,4), considerando apenas mutações de vigilância CPR e em 15 (16,66%) considerando todas as mutações descritas no algoritmo clínico de *Stanford*,

Apesar da TDRM ser um pouco mais comum em países de alta renda, onde diferentemente do Brasil, é rotina fazer o exame de genotipagem antes de iniciar o tratamento, este impacto pode ser menor, situação na qual o tratamento baseado na genotipagem consegue alcançar taxas de sucesso muito elevadas (Pennings, 2013).

Guimarães e col. avaliaram a TDRM entre adultos e crianças recém diagnosticadas, com amostras colhidas entre 2012 e 2014, no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, e encontrou na região de Campinas 16% (7/44), na cidade de São Paulo 11% (8/74) e na região do ABCD 5% (5/99), sendo que entre os 99 casos da região do ABCD, 84 eram do nosso estudo. (Guimarães et al., 2015) (anexo 4). A resistência transmitida foi avaliada anteriormente pelo mesmo grupo, em amostras colhidas de 2008 a 2009, sendo detectada em 9,6% (15/156) na região de Campinas e 2,9% (2/69) na cidade de São Paulo (Ferreira et al., 2013), sugerindo um aumento na



frequência em relação ao período de 2012 a 2014. Alencar e col. num estudo de TDRM entre doadores de sangue no Brasil, com amostras colhidas entre 2007 e 2011, encontrou 19,4% em São Paulo (95% IC: 9.5 a 29.2) (Alencar et al., 2013). Nos pacientes do nosso estudo a presença de TDRM parece mais baixa, em comparação às encontradas em São Paulo e Campinas. Segundo a WHO em suas recomendações para a vigilância da TDRM, que categoriza a resistência a cada classe de drogas relevantes como menor que 5%, 5-15% ou maior que 15 (Bennett et al., 2008), nossos resultados já apontam para um nível intermediário de resistência. Cabe lembrar que nossa casuística é pequena, e os pacientes estudados quanto a TDRM (Grupo DR), tem características um pouco diferentes dos pacientes incluídos no serviço por demanda usual (Grupo ARMI). Além deste estudo, ser o primeiro na região,

Deste modo faz-se necessário o monitoramento contínuo, que permitirá uma melhor compreensão desta dinâmica e da evolução destas taxas de TDRM. Não menos importante é avaliar o impacto clínico destas mutações na resposta a medicação e na supressão viral na evolução.

## 6. Conclusão

É possível identificar e incorporar casos agudos, mesmo nas condições atuais dos serviços SUS, embora um esforço adicional deva ser implementado para aumentar esta identificação e incorporação, uma vez que a maioria das infecções agudas, mesmo sintomáticas, passam despercebidas em ambulatórios e pronto socorros do país.

Tendo em vista a inespecificidade das manifestações relacionadas a infecção aguda pelo HIV, comum a outras viroses, obtemos uma razoável sensibilidade na identificação aplicando o algoritmo do estudo. Estudos com uma maior amostragem e sua aplicação em outros ambientes necessitam ser avaliados.

Os pacientes em fase aguda da doença identificados apresentam perfis clínicos distintos, ilustrando a plethora de situações onde a condição deva ser investigada.

O risco de ocorrência da infecção aguda de lactentes, amamentados por mães recém infectadas, como no caso identificado, aponta para uma importante lacuna no cenário atual, que necessita de maior atenção para atingirmos a meta de eliminação da transmissão vertical do HIV.

Parece importante alertar as demais sociedades médicas sobre a importância da identificação destes pacientes agudos, principalmente as de ginecologia, pediatria e clínica médica, incluindo os serviços de urgência/emergência. Em especial na obstetrícia e pediatria, visando a eliminação da transmissão vertical do HIV.

Esforços também devem ser implementados na identificação dos pacientes crônicos, em todos os pontos de assistência e oportunidades, pois 23% dos pacientes apresentaram no diagnóstico CD4 menor que 200 céls/mL, com um importante número de casos de óbitos por diagnóstico tardio, sem sequer iniciar tratamento ARV, assim como vários casos de coinfeção com tuberculose.

A resistência genotípica a um ou mais medicamento antirretrovirais, sugere níveis inferiores ao observado em alguns estudos.

A presença do subtipo C apresentou uma proporção de casos superior quando comparado a casos mais antigos do mesmo serviço.

Nosso estudo, portanto, fornece um panorama preliminar do perfil e das características moleculares dos casos recém diagnosticados, favorecendo o entendimento da epidemia e subsidiando as ações nessa importante região da área metropolitana de São Paulo.

O seguimento dos casos com a avaliação da supressão é fundamental para avaliar o impacto na vida das PVHA e na estratégia TasP, visando o fim da epidemia.

## 7. Referências Bibliográficas

Alencar CS, Sabino EC, Carvalho SM, et al.: HIV genotypes and primary drug resistance among HIV-seropositive blood donors in Brazil: Role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 63(3):387–392.

Anderson JL, Fromentin R, Corbelli GM, Ostergaard L, and Ross AL. Progress towards an HIV cure: update from the 2014 International AIDS Society Symposium. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015 an; 31(1):36-44.

Andersson E, Shao W, Bontell I, Cham F, Cuong do D, Wondwossen A, et al., Evaluation of sequence ambiguities of the HIV-1 pol gene as a method to identify recent HIV-1 infection in transmitted drug resistance surveys. *Infect Genet Evol*. 2013 Aug; 18:125-31.

Bastos FI e Bertoni N. Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras? Rio de Janeiro: Editora ICICT/FIOCRUZ, 2014.

Bastos, F. Taxas de infecção de HIV e sífilis e inventario de conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas as infecções sexualmente transmissíveis entre usuários de drogas em 10 municípios brasileiros. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2009.

Bellan SE, Dushoff J, Galvani AP, Meyers LA. Reassessment of HIV-1 Acute Phase Infectivity: Accounting for Heterogeneity and Study Design with Simulated Cohorts. *PLoS Med*. 2015 Mar 17; 12(3): e1001801.

Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther*. 2008;13 Suppl 2:25-36.

Boletim Epidemiológico - AIDS e DST. Ministério da Saúde Ano III - nº 1 - 27ª a 52ª - semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2013 - 01ª a 26ª - semanas epidemiológicas – janeiro a junho de 2014.

Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, et al. Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. *MMWR Recomm Rep.* 2006; 55:1–17.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília, 2013. Disponível em: <[http://www.AIDS.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo\\_13\\_3\\_2014\\_pdf\\_28003.pdf](http://www.AIDS.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf)>. Acesso em: 24/04/2015)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes. Brasília, 2014a. Disponível em: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/55939/08\\_05\\_2014\\_protocolo\\_pediatico\\_pdf\\_36225.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/55939/08_05_2014_protocolo_pediatico_pdf_36225.pdf) (Acesso em 08/06/2015)

Brenner BG, Roger M, Routy JP, Moisi D, Ntemgwa M, Matte C, et al. Quebec Primary HIV Infection Study Group. High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2007 Apr 1;195(7):951-9.

Brígido LF, Ferreira JL, Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, Estevam DL, et al. São Paulo HIV Salvage Workgroup. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 Mar; 27(3):339-44.

Buchanan JG, Goldwater PN, Somerfield SD, Tobias MI. Mononucleosis-like-syndrome associated with acute AIDS retrovirus infection. *N Z Med J.* 1986 Jun 11; 99(803):405-7.

Centers for Disease Control (CDC 1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981 Jul 3; 30(25):305-8.

Centers for Disease Control (CDC 1993). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA.* 1993 Feb 10; 269(6):729-30.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2011). HIV surveillance—United States, 1981-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011 Jun 3; 60(21):689-93.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2014). Revised surveillance case definition for HIV infection--United States, 2014. *MMWR Recomm Rep.* 2014 Apr 11; 63(RR-03):1-10. PubMed PMID: 24717910.

Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM. The detection of acute HIV infection. *J Infect Dis.* 2010 Oct 15; 202 Suppl 2: S270-7.

Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2011a May 19; 364(20):1943-54

Cohen, MS; Chen, YQ; Mccauley, M; Gamble, T, Hosseinipour, MC; Kumarasamy, N. et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2011b; 365: 493-505.

Cohen MS, et al. results of the HPTN 052 randomized controlled trial: antiretroviral therapy prevents HIV transmission. Program number MOAC0106LB, Track C. 8th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment & Prevention (IAS 2015) in Vancouver, Canada.

Cousins MM, Konikoff J, Sabin D, Khaki L, Longosz AF, Laeyendecker O, et al. A comparison of two measures of HIV diversity in multi-assay algorithms for HIV incidence estimation. *PLoS One.* 2014 Jun 26; 9(6): e101043.

De Caluwé JP, Dourov N, Thiry L, Sprecher-Goldberger S, Stoffels G. Mononucleosis-like illness and lymphocytic meningitis as the clinical presentation of an acute HIV infection. *Acta Clin Belg.* 1987; 42(5):330-5.

Department of Health and Human Services (DHHS). Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Disponível em <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Acessado em 06/05/2015

Diaz RS e Vázquez VS. Infecção pelo HIV e terapia antirretroviral em 2013. São Paulo: Permanyer Brasil Publicações; 2013.

Drake AL, Wagner A, Richardson B, John-Stewart G. Incident HIV during pregnancy and postpartum and risk of mother-to-child HIV transmission: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2014 Feb 25; 11(2)

Fazito-Rezende, E. L. L.; Vasconcelos, A. M. N.; Pereira, M. G. Causes of death among people living with HIV/AIDS in Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 2010; 14 (6):558-563.

Ferreira JL, Rodrigues R, Lança AM, de Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, et al. Transmitted Drug Resistance among People Living with HIV/Aids at Major Cities of Sao Paulo State, Brazil. Adv Virol. 2013.

Frange P, Faye A, Avettand-Fenoel V, Bellaton E, Deschamps D, Angin M, et al. HIV-1 virological remission for more than 11 years after interruption of early initiated antiretroviral therapy in a perinatally-infected child. Program number MOAA 0105LB, Oral Abstract Sessions. 8th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment & Prevention (IAS 2015) in Vancouver, Canada.

Fundação IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. População brasileira e do município de Santo André/SP <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=354780>, acesso em 24/04/2015.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immuno deficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220: 865-867.

Gallo R, Montagnier L. HIV's leading men. *IAVI Rep.* 2011 May-Jun; 15(3):13-4.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):436-41.

Guimarães PM, Ferreira JL, Coelho LP, Cavalcanti JS, Lopes GI, Matsuda EM, et al. Transmitted drug resistance among recently diagnosed adults and children in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015 Mar 31.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999:95–98

Hauser A, Santos-Hoevener C, Meixenberger K, Zimmermann R, Somogyi S, Fiedler S, et al. Improved testing of recent HIV-1 infections with the BioRad avidity assay compared to the limiting antigen avidity assay and BED Capture enzyme immunoassay: evaluation using reference sample panels from the German Seroconverter Cohort. *PLoS One.*2014 Jun 3; 9(6):e98038.

Hull M, Lange J, Montaner JS. Treatment as prevention--where next? *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014 Dec; 11(4):496-504.

Humphrey JH, Marinda E, Mutasa K, Moulton LH, Liff PJ, Ntozini R, et al. ZVITAMBO study group. Mother to child transmission of HIV among Zimbabwean women who seroconverted postnatally: prospective cohort study. *BMJ.* 2010 Dec 22;341:c6580.

INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med.* 2015 Aug 27; 373(9):795-807.

Kelley CF, Barbour JD, Hecht FM. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:445–448.



Kerr, L. Comportamento, atitudes, praticas e prevalência de HIV e sífilis entre homens que fazem sexo com homens (HSH) em 10 cidades brasileiras. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2009.

Kessler HA, Blaauw B, Spear J, Paul DA, Falk LA, Landay A. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. *JAMA*. 1987 Sep 4; 258(9):1196-9.

Kinuthia J, Drake AL, Matemo D, Richardson BA, Zeh C, Osborn L, et al. HIV acquisition during pregnancy and postpartum is associated with genital infections and partnership characteristics. *AIDS*. 2015 Sep 24;29(15):2025-33.

Li JZ, Gandhi RT. The sooner, the better: more evidence that early antiretroviral therapy lowers viral reservoirs in HIV-infected infants. *J Infect Dis*. 2014 Nov 15; 210(10):1519-22.

Ma ZM, Stone M, Piatak M Jr, Schweighardt B, Haigwood NL, Montefiori D, et al. High specific infectivity of plasma virus from the pre-ramp-up and ramp-up stages of acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2009 Apr; 83(7):3288-97.

Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases, editors Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin. 7<sup>a</sup> ed., Elsevier, Philadelphia, 2010. P. 2323-2335.

Marinda ET, Moulton LH, Humphrey JH, Hargrove JW, Ntozini R, Mutasa K, et al. In utero and intra-partum HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection during pregnancy: using the BED capture enzyme-immunoassay as a surrogate marker for acute infection. *Int J Epidemiol*. 2011 Aug; 40(4):945-54.

Marins, J. R. P.; Jamal, L. F.; Chen, S. Y.; Barros, M. B.; Hudes, E. S.; Barbosa-Jr, A.; Chequer, P.; Teixeira, P. R.; Hearst, N. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS*, [S.l.], v. 17, p. 1675-1682, 2003.

Marrazzo JM, Del Rio C, Holtgrave DR, Cohen MS, Kalichman SC, Mayer KH, et al.; International Antiviral Society-USA Panel. HIV prevention in clinical care settings: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. JAMA. 2014 Jul 23-30;312(4):390-409. Erratum in: JAMA. 2014 Jul 23-30;312(4):403. JAMA. 2014 Aug 13;312(6):652.

Matida, L. H.; Ramos-Jr, A. N.; Marques, H. H. S.; Della Negra, M.; Succi, R. C. M.; Hearst, N. Ampliação da sobrevivência de crianças com AIDS: uma resposta brasileira sustentável. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS DST, Brasília, Ano V, n. 1, 2008.

Matsuda EM, Coelho LPO, Soares FC, Vichessi DF, Chong AA, Campos, NC, et al. Diagnóstico de Infecção Aguda pelo HIV Prevenindo Transmissão por Aleitamento Materno. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Infectologia, 2013, Fortaleza. Braz J Infec Dis.2013;17 Supl C:91123.

Matsuda EM, Coelho LPO, Guimarães PM, Ferreira JLP, Gomes AM, Lobo R, et al. Infecção pelo HIV-1 subtipo C entre casos recentemente identificados superior a observada entre infecções antigas na Região do ABC. Anais do 9º Congresso Paulista de Infectologia, 2014a maio 21-28; Atibaia-SP.

Matsuda EM, Coelho LP, Pimentel VF, Onias HB, Brígido LF. An HIV-1 transmission case possibly associated with manicure care. AIDS Res Hum Retroviruses. 2014b Nov;30(11):1150-3.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - AIDS e DST. Ministério da Saúde Ano III - nº 1 - 27ª a 52ª - semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2013 - 01ª a 26ª - semanas epidemiológicas – janeiro a junho de 2014a.

Ministério da Saúde. Transmissão Vertical do HIV e Sífilis: Estratégias para Redução e Eliminação. 2014b

Ministério da Saúde. História da AIDS | Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, <http://www.AIDS.gov.br/pagina/historia-da-AIDS>, (acesso em 25/04/2015)

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Profilaxia Antirretroviral Pós-Exposição de Risco à Infecção pelo HIV. 2015

Montaner, J. S. G.; Lima, V. D.; Barrios, R.; Yip, B.; Wood, E.; Kerr, T. 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. *Lancet Infect. Dis.*, [S.I.], v. 376, p. 532-39, 2010.

Nosyk, B.; Montaner, J. S. G.; Colley, G.; Lima, V. D.; Chan, K.; Heath, K. The cascade of HIV care in British Columbia, Canada, 1996-2011: a population-based retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, [S.I.], v. 14, n. 1, p. 40-9, jan. 2014.

Patel P, Klausner JD, Bacon OM, Liska S, Taylor M, Gonzalez A, et al. Detection of acute HIV infections in high-risk patients in California. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 May; 42(1):75-9.

Pennings PS. HIV Drug Resistance: Problems and Perspectives. *Infect Dis Rep.* 2013 Jun 6;5(Suppl 1):e5.

Piette AM, Tusseau F, Chapman A. Acute symptomatology in HIV virus primo-infection. 2 cases. *Presse Med.* 1987 Feb 28; 16(7):346-8. French.

Pilcher CD, Eron JJ Jr, Vemazza PL, Battegay M, Harr T, Yerly S, et al. Sexual transmission during the incubation period of primary HIV infection. *JAMA.* 2001 Oct 10; 286(14):1713-4.

Pilcher CD, Fiscus SA, Nguyen TQ, Foust E, Wolf L, Williams D, et al. Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. *N Engl J Med.* 2005 May 5; 352(18):1873-83.

Powers KA, Ghani AC, Miller WC, Hoffman IF, Pettifor AE, Kamanga G, et al. The role of acute and early HIV infection in the spread of HIV and

implications for transmission prevention strategies in Lilongwe, Malawi: a modelling study. *Lancet*. 2011 Jul 16; 378(9787):256-68.

Priddy FH, Pilcher CD, Moore RH, Tambe P, Park MN, Fiscus SA, et al. Detection of acute HIV infections in an urban HIV counseling and testing population in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007 Feb 1; 44(2):196-202.

Quagliarello V. The Acquired Immunodeficiency Syndrome: current status. *Yale J Biol Med*. 1982 Sep-Dec; 55(5-6):443-52. Review.

Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. ANRS VISCONTI Study Group. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog*. 2013 Mar;9(3): e1003211.

Sierra-Enguita R, Rodriguez C, Aguilera A, Gutierrez F, Eiros JM, Caballero E, et al. Spanish HIV Seroconverter Study Group. X4 tropic viruses are on the rise in recent HIV-1 seroconverters in Spain. *AIDS*. 2014 Jul 17; 28(11):1603-9.

Soudeyns H. Understanding risk factors for incident maternal HIV-1 infection. *AIDS*. 2015 Sep 24;29(15):2053-4.

Stadeli KM, Richman DD. Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: a systematic review. *Antivir Ther*. 2013;18(1):115-23.

Szwarcwald, C. L. Taxas de prevalência de HIV e sífilis e conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas as infecções sexualmente transmissíveis nos grupos das mulheres profissionais do sexo, no Brasil. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2009.

Véras NM, Gray RR, Brígido LF, Rodrigues R, Salemi M. High-resolution

phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. *J Gen Virol.* 2011 Jul; 92(Pt 7):1698-709.

UNAIDS. 90–90–90. Ambitious treatment targets: writing the final chapter of the AIDS epidemic – a discussion paper. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2014 (<http://www.unaids.org/en/resources/documents/2014/90–90–90>, accessed 21 de setembro 2015).

Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, Kiwanuka N, et al. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis.* 2005 May 1; 191(9):1403-9.

Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med.* 2014 Jun-Jul; 22(3):642-50.

WHO. Consolidated Guidelines on HIV Testing Services 2015. Geneva: World Health Organization; 2015 Jul.

Zhang X, Zhong L, Romero-Severson E, Alam SJ, Henry CJ, Volz EM, et al. Episodic HIV risk behavior can greatly amplify HIV prevalence and the fraction of transmissions from acute HIV infection. *Stat Commun Infect Dis.* 2012 Nov 1; 4(1).

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO RECENTE PELO HIV COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR NOVAS INFECÇÕES

**Pesquisador:** ELAINE MONTEIRO MATSUDA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 04711312.5.1001.5484

**Instituição Proponente:**

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 177.763

**Data da Relatoria:** 06/11/2012

**Apresentação do Projeto:**

ok

**Objetivo da Pesquisa:**

ok

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

ok

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisadora apresentou as alterações sugeridas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

ok

**Recomendações:**

A pesquisadora deverá mandar o resultado final em um ano ou relatório parcial anual até o término do trabalho.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

ok

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Praça IV, Centenário nº 1

**Bairro:** Centro

**CEP:** 09.015-080

**UF:** SP

**Município:**

**Telefone:** (114)433.-0475

**Fax:** (114)433.-0399

**E-mail:** tsribeiro@santoandre.sp.gov.br

SECRETARIA MUNICIPAL DE  
SAÚDE DE SANTO ANDRÉ/  
PREFEITURA MUNICIPAL



**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

19 de Dezembro de 2012

---

**Assinador por:**  
**ELIANE LIMA GUERRA NUNES**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Praça IV, Centenário nº 1

**Bairro:** Centro

**CEP:** 09.015-080

**UF:** SP

**Município:**

**Telefone:** (114)433.-0475

**Fax:** (114)433.-0399

**E-mail:** tsribeiro@santoandre.sp.gov.br

## PROJETO DE PESQUISA

---

**Título:** MONITORAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV-1

**Pesquisador:** Luis Fernando de Macedo Brigido

**Versão:** 1

**Instituição:** Instituto Adolfo Lutz

**CAAE:** 02298012.6.0000.0059

---

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

---

**Número do Parecer:** 23685

**Data da Relatoria:** 17/05/2012

### Apresentação do Projeto:

Estudo observacional e prospectivo de indivíduos expostos a risco de infecção pelo HIV em fase de confirmação diagnóstica ou diagnóstico recente, a ser realizado no Instituto Adolfo Lutz em parceria com o Instituto de Infectologia Emilio Ribas. A diversidade do HIV decorrente da uma importante variabilidade de seu genoma é uma característica fundamental deste microrganismo. Diferentes mecanismos intrínsecos ao vírus são as fontes mais importantes desta diversidade. O HIV pode ser classificado em dois tipos, o HIV-1, sendo seu grupo M o responsável pela pandemia de AIDS e o HIV-2, mais restrito geograficamente, menos patogênico e possivelmente com menor potencial epidêmico. As fases da infecção do HIV-1 podem ser divididas em aguda e crônica. A infecção recente tem sido considerada como os primeiros 6 meses a dois anos após a infecção inicial, englobando a fase aguda. O estudo do vírus presente nessa fase inicial da infecção favorece o monitoramento da resistência transmitida e o estudo da dinâmica molecular da epidemia, podendo subsidiar o desenvolvimento de insumos inovadores como vacinas. A proposta deste estudo é monitorar o vírus incidente em sítios clínicos selecionados, que tanto recebem indivíduos em busca de diagnóstico da infecção pelo HIV como os que apresentam sintomas compatíveis com infecção aguda por esse agente. A documentação do seguimento clínico de parte desses casos incidentes poderá ainda contribuir no entendimento da evolução molecular do vírus no paciente e a compreensão do papel da diversidade viral na patogênese da infecção pelo HIV-1.

### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Contribuir na monitoração da evolução da epidemia de HIV/AIDS em nosso meio, apoiando iniciativas de vigilância epidemiológica através da caracterização preliminar do HIV-1 a partir de pacientes recentemente infectados, com vistas à compreensão dos eventos epidemiológicos, clínicos, virológicos e imunológicos associados à infecção incidente pelo HIV.

Objetivos Secundários:

1. Contribuir na construção do conhecimento sobre eventos associados à infecção recente pelo HIV em nosso meio, através da análise de parâmetros imunológicos e virológicos em indivíduos recentemente infectados na população geral, em coortes de sorocidência e de participantes de ensaios preventivos do HIV/AIDS, favorecendo o entendimento da história natural da infecção recente;
2. Estimar incidência da infecção em diferentes segmentos da população a partir de análises sorológicas e de ambiguidade genômica;
3. Contribuir na monitoração da emergência de variantes resistentes à antirretrovirais em uso e em introdução (novas classes);
4. Analisar parâmetros imunológicos e inflamatórios, como a análise do número e das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8;
5. Obter isolados do HIV a partir de indivíduos soropositivos conversores recentes (isolados precoces) e em especial de isolados pré-ímmunes, de indivíduos com evidências de infecção aguda, porém sem evidências de resposta imunológica pelo hospedeiro;
6. Determinar o padrão de cinética de replicação de isolados primários através da detecção de produtos virais no sobrenadante de cultura de linfócitos de sangue periférico;
7. Seqüenciar regiões do genoma viral com o intuito de contribuir na monitoração da evolução da diversidade (segmentos do genes env, pol e gag), e na determinação de mutações associadas à resistência aos ARV ( genes pol, RT);
8. Dar suporte ao acompanhamento clínico de indivíduos soroconvertores, subsidiando o manejo clínico destes pacientes em suas unidades de saúde;



9. Monitorar o impacto do tratamento precoce e a emergência de variantes resistentes em indivíduos em uso de medicação antirretroviral;
10. Avaliar associações entre eventos virológicos e parâmetros clínico-laboratoriais relacionados ao tempo de soroconversão e a modulação da evolução clínica destes indivíduos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: relacionados aos riscos inerentes às coletas de sangue (claros no TCLE) e, quando possível, as amostras para a pesquisa serão obtidas no momento de coletas para os exames de rotina, reduzindo o número de coletas adicionais.

Benefícios: aplicam-se ao sujeito da pesquisa onde as informações dos resultados serão repassados às unidades de saúde, que podem subsidiar decisão clínica quanto ao tratamento; seguimento no estudo pode melhorar adesão a prevenção de transmissão secundária do HIV e outras DST; também podem trazer contribuição para a comunidade no combate à AIDS e no uso mais adequado dos medicamentos antirretrovirais.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estrutura do protocolo está adequada com critérios de inclusão definidos. Trata-se de estudo observacional e prospectivo de duração de 3 anos com 320 indivíduos com evidências de infecção recente pelo HIV, através do monitoramento de eventos virológicos, imunológicos, clínicos e epidemiológicos. Após consentimento esclarecido será realizada pequena entrevista e aconselhamento, que deverá ser adequada à situação local nas unidades onde esta atividade já estiver ocorrendo. Posteriormente, será coletado material para isolamento e caracterização viral. Este estudo envolve uma parceria clínica que deve incluir consultas clínicas, aconselhamento, exames gerais, avaliação imunológica, inflamatória, seqüenciamento de regiões genômicas, quantificação de viremia plasmática, quantificação de subpopulações de células CD4+ e CD8+ e caracterização biológica preliminar de HIV.

A análise estatística com metodologias definidas, realizadas a partir de informações armazenadas banco de dados em Epiinfo 6.04 para análises univariáveis, análises multivariáveis (Stata e Prisma), análises filogenéticas com programas específicos disponíveis (tipo Clustal e Philip) e avaliação da relevância das mutações nas regiões da transcriptase reversa e protease, associadas a resistência à antirretrovirais.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de Rosto na qual o pesquisador responsável e Diretor Geral do instituto assumem compromisso com o desenvolvimento da pesquisa;

TCLE: o pesquisador apresenta um TCLE para adulto e outro para menores de 18 anos e um Termo de Assentimento informado. Os documentos estão bem elaborados, com linguagem clara e de fácil entendimento; Declaração de aprovação do mérito científico;

Documento de anuência da instituição parceira - Instituto de Infectologia Emilio Ribas.

#### **Recomendações:**

Atender as normas éticas e manter a confidencialidade das informações e dados dos sujeitos de pesquisa.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Estudo de interesse em saúde pública, que poderá contribuir para o monitoramento da epidemia de HIV/AIDS em nosso meio, assim como gerar informações para a comunidade científica.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 18 de Maio de 2012

---

Assinado por:

Luz Marina Trujillo

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

**PROJETO DE PESQUISA**

**DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO RECENTE PELO HIV COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR NOVAS INFECÇÕES**

- O **AMBULATORIO DE REFERÊNCIA EM MOLÉSTIAS INFECCIOSAS (ARMI)** e o **CENTRO DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO (CTA)** em colaboração com Instituto Adolfo Lutz, das Unidades de Saúde e da Vigilância Epidemiológica do Município de Santo André estão realizando um estudo para **DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO RECENTE PELO HIV COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR NOVAS INFECÇÕES**. A Infecção aguda ou recente pelo HIV é um período de alto risco de transmissão, conseqüentemente a detecção precoce da infecção pelo HIV pode prevenir uma significativa proporção de novas transmissões. O objetivo deste projeto é contribuir na prevenção de novas infecções pelo HIV, mediante diagnóstico dos indivíduos com sintomas de HIV agudo, ou assintomáticos infectados recentemente que são fonte de uma proporção importante de novas infecções na comunidade. Além de: Prevenir infecção pelo HIV em gestantes e conseqüente transmissão da mãe para o filho; Inserir os pacientes infectados pelo HIV no Ambulatório de Referência em Moléstias Infecciosas do Município de Santo André, promovendo um adequado acompanhamento clínico; Identificar os principais sinais e sintomas relacionados à infecção aguda; Verificar as características epidemiológicas da população com exposição de risco.
- A sua participação no estudo implicará no seguinte:
  - 1) Anotação pelo profissional do ARMI/CTA de informações sobre a sua exposição de risco para aquisição do HIV em seu Prontuário Médico, de forma confidencial, não sendo identificado o seu nome em nenhum momento, durante ou após o estudo, garantindo a sua privacidade e anonimato. Serão utilizados códigos para sua identificação, sendo permitido o acesso apenas ao respectivo médico e aos responsáveis pelo estudo.
  - 2) Coleta de sangue (2 tubos de sangue), o correspondente a duas colheres de sopa, realizada no braço, podendo haver os inconvenientes dessas coletas, como leve dor no local da picada da agulha ou hematoma (mancha roxa). Todas as medidas serão tomadas para que não ocorram problemas. As amostras serão coletadas no Setor de coleta do seu serviço clínico ou local determinado pelo seu médico e sempre que possível a coleta será realizada junto com a coleta de seus exames de rotina, realizadas na entrada do estudo, e no mês doze.
  - 3) Caso você possua material biológico (sangue) armazenado na Instituição que você é atendido este material também poderá ser analisado para a realização retrospectiva destas análises, se for mais adequado.
  - 4) Estes exames são os mesmos necessários mesmo que você não participe do estudo, e caso você não queira participar deste estudo, sua recusa não ocasionará em nenhum prejuízo ao seu atendimento médico.

Este estudo não garante que haja benefícios diretos para você, mas as informações coletadas e analisadas em conjunto, poderão contribuir muito para o combate da AIDS, na atenção a pessoas vivendo com HIV/AIDS, no desenvolvimento de estratégias para prevenção da infecção.

**Após leitura desse texto, compreendi os objetivos do estudo e CONCORDO em participar como voluntário.**

Assinatura do aplicador TCLE \_\_\_\_\_

Nome completo do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Santo André, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Se desejar outros esclarecimentos sobre a pesquisa, pode contatar a pesquisadora Elaine Monteiro Matsuda, responsável pela pesquisa, pelos telefones 11- 9 95939549.

# Transmitted Drug Resistance Among Recently Diagnosed Adults and Children in São Paulo, Brazil

Paula Morena de Souza Guimarães,<sup>1</sup> João Leandro de Paula Ferreira,<sup>1</sup> Luana Portes Ozório Coelho,<sup>1</sup> Jaqueline de Souza Cavalcanti,<sup>1</sup> Giselle Ibetete Silva Lopez Lopes,<sup>1</sup> Elaine Monteiro Matsuda,<sup>2</sup> Flávia Jacqueline Almeida,<sup>3</sup> Valéria Correia Almeida,<sup>4</sup> Alexandre Ely Campeas,<sup>5</sup> Luiz Carlos Pereira Junior,<sup>5</sup> Luís Fernando de Macedo Brígido,<sup>1</sup> and the São Paulo Salvage Workgroup

## Abstract

Transmitted drug resistance mutations (TDRM) have been a constant threat to treatment efficacy. We evaluated TDRM in plasma RNA of 217 antiretroviral therapy-naïve patients from sites in the São Paulo metropolitan area, collected from 2012 to 2014. The partial HIV-1 polymerase region was sequenced using Big Dye terminators at an ABI 3130 Genetic Analyzer. TDRM was defined according to the Stanford database calibrated population resistance (CPR v.6.0), but other drug resistance mutations (DRM) considered at the IAS list (IAS, 2014) and at the Stanford HIV Database Genotyping Resistance Interpretation (GRI-HIVdb) were also described. Out of 78% (170/217) of patients with information on the time of diagnosis, most (83%, 141/170) had been recently diagnosed, with the first positive HIV serology at a median of 58 days (IQR 18–184). Subtype B predominated (70%), followed by subtype F (10%), BF (7.5%), C (7.5%), and BC (5%). TDRMs were observed in 9.2% (20/217, CI 95% 5.9% to 13.6%), mostly (5.2%) to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) antiretroviral class. Among children and adolescents, only a single patient showed TDRMs. Additional non-CPR mutations were observed: 11.5% (25/217) according to IAS or 4.6% (10/217) according to GRI-HIVdb. Overall, 23.5% (51/217) of the cases had one or more DRM identified. TDRM prevalence differed significantly among some sites. These trends deserve continuous and systematic surveillance, especially with the new policies of treatment as prevention being implemented in the country.

## Introduction

WITH ENHANCED ACCESS to antiretroviral therapy (ART), reductions in morbidity and mortality related to HIV infection have become even clearer, improving the quality of life of patients living with HIV/AIDS. However, the development of resistance to antiretroviral drugs and the potential for its transmission have been constant threats as they may reduce therapy efficacy.<sup>1,2</sup> The pretreatment genotypic test identifies resistance that might compromise initial therapy, and upon treatment failure allows a better virological response with a genotypic test-guided therapy.<sup>3</sup> However, its cost and accessibility have limited its widespread use in resource-limited settings. Monitoring the prevalence trends of transmitted drug resistance mutations (TDRM) could help in the identification of more adequate

antiretroviral combinations and generate prevalence estimates that, when reaching a given threshold, indicate the need for the introduction of the pretreatment genotypic test as part of routine care.<sup>4–25</sup>

In Brazil, most studies in TDRM prevalence documented low to intermediate rates,<sup>4,7–9,10,15,19,25</sup> but different potential limitations can compromise comparability of these studies such as differences in sample size and recruitment design. We reevaluate, using a similar methodology, previous study sites<sup>4</sup> and new ones in the major metropolitan area of São Paulo, Brazil.

## Materials and Methods

Blood samples from 226 HIV-1 antiretroviral therapy-naïve patients were collected from May 2012 to July 2014 in

<sup>1</sup>Retrovirus Laboratory, Virology Center, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Santo André Aids Program, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Division of Pediatric Infectious Diseases, Santa Casa de São Paulo Hospital, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>DST/Aids Reference Center, Campinas, Brazil.

<sup>5</sup>Emílio Ribas Infectious Diseases Institute, São Paulo, Brazil.

three areas of the São Paulo metropolitan area: (1) sites in the city of São Paulo; (2) sites in neighboring cities southeast of São Paulo, ABCD (Santo Andre, São Bernardo do Campo, São Caetano do Sul, and Diadema); and (3) sites in Campinas, the second largest metropolitan area in the state, about 100 km from São Paulo. The study enrolled consecutive HIV-1 antiretroviral therapy-naïve patients of all age groups recruited specifically for the study or from physicians' request as part of the clinical follow-up. Clinical and demographic data were obtained at baseline visit when informed consent was obtained from subjects or either parents or guardians. Patients younger than 12 years old were categorized as children, 12 years to 18 years as adolescents, and those over 18 years old as adults. Time from first HIV serological diagnosis allowed classifying patients as recent (less than 2 years from diagnosis) and long-term HIV infection (over 2 years from diagnosis).

Sequences were obtained from plasma viral RNA, extracted (QIAmp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) and amplified with an "in-house" adapted methodology. The amplification of the partial HIV polymerase region (codons 1–235 related to HXB2, accession number K03455) was obtained using primers previously described<sup>5,24</sup> in an adapted nested polymerase chain reaction (PCR).<sup>4,25</sup> The reverse transcriptase (RT)-PCR was performed using 10 µl of viral RNA in a 50 µl volume reagent mix containing 10× PCR buffer High Fidelity, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM dNTP's (Life Technologies, USA), 0.1 M DTT, 10 U RNase inhibitor (New England Biolabs, UK), 50 U RT SuperScript III (Life Technologies, USA), 1.25 U Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, USA), and 10 µM of primers (GAG2: 5'-GAGGAAGCTGCAGAATGGG-3' forward) and (RT137: 5'-TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC-3' reverse). The RT-PCR was carried out at 50°C for 30 min and 94°C for 5 min, followed by amplification cycles: 18 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 68°C for 2 min 30 s; 17 cycles at 94°C for 30 s, 53°C for 30 s, 68°C for 2 min 30 s, and a final extension at 68°C for 10 min.

A 2.5 µl volume of the RT-PCR product was used in a nested PCR performed with Go Taq Green Master Mix 2X (Promega Biosciences, CA) and 10 µM of primers (PR3: 5'-AGAGCCAACAGCCCCACCA-3' forward) and (RT12: 5'-ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA-3' reverse). The nested PCR was carried out at 94°C for 3 min followed by 35 cycles of at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min.

An unique fragment of approximately 1,112 bp was sequenced with Big Dye using eight primers to cover the partial pol region (codon 1 to 235). Sequences were manually edited using Sequencher 4.7 software (Gene Codes, USA). Ambiguous DNA bases (mixtures) were considered at sequence edition and were counted as a resistance-associated codon when one or more deduced amino acids were considered resistance mutations.

HIV genotyping resistance test results (Stanford HIV database genotype resistance report, GRI-HIVdb) were reported to the clinical sites to subsidize clinical follow-up. TDRMs were defined according to the Calibrated Population Resistance Version 6.0 (CPR, Stanford Database, SDRM 2009), a specifically designed algorithm for the epidemiologic surveillance of HIV-1 transmitted drug resistance mutations (DRM). DRMs listed in bold in the International

Antiviral Society (IAS, 2014) and the Stanford HIV Database Genotyping Resistance Interpretation (GRI-HIVdb) were also described to evaluate additional mutations that might have an impact on ART treatment.

HIV-1 subtyping was initially performed with NCBI Genotyping and REGA HIV Subtyping tools and confirmed with phylogenetic analysis using BEAST v1.7.4, under the GTR+I+G model. Recombinant patterns were evaluated by SimPlot (v. 3.5.1 recombination software).

#### Statistical analysis

Data were analyzed with Epi Info 6 (CDC, Atlanta, GA), applying a level of statistical significance of 0.05, two tailed. Categorical variables were tested using Yates or Fisher's exact test. Results of continuous variables were expressed as the median and interquartile range (IQR). Mid-p 95% was used to calculate the confidence interval.

#### Ethical approval

This study was approved by Ethical and Research Committees of Adolfo Lutz Institute, Secretary of Health of São Paulo, Brazil and participating institutions.

#### Results

From 226 HIV-1 antiretroviral therapy-naïve patients enrolled in this study, we could successfully amplify and perform 217 (96%) partial HIV-1 *pol* sequences, except for one case with only the protease region.

Demographic characteristics are depicted in Table 1. Three women enrolled in the study had previous exposure to short-term use of ART for mother-to-children transmission prophylaxis, all of them without detected resistance mutations; one additional male patient (BRSP417-14) with long-term infection was found subsequently to have had a previous 1 month prescription of zidovudine (AZT)+ didanosine (ddI). This case had a secondary non-CPR IP mutation considered by the Stanford Database algorithm to confer potential low-level resistance to tipranavir. Ten women (4.6%) were pregnant, but none of them had been exposed to ART prophylaxis at blood collection. Perinatal infection was found mostly among children (11/17, 64.7%) and then adolescents (2/14, 14.2%), with some adolescents (3/14, 21.4%) reporting homosexual behavior.

From 217 patients, 78% (170/217) had information about the time of diagnosis; most (141/170, 83%) had been recently diagnosed, with the first positive HIV serology at a median of 58 days (IQR 18–184), with 17% (29/170) classified as long-term infection (median 1998 days, IQR 1281–3523).

As observed in previous studies,<sup>4,7–10</sup> subtype B predominated in 70% (130/186) of HIV-1 *pol* sequences among adults, with subtypes C and F in 15/186 (8%) and 14/186 (7.5%), respectively. Recombinant forms of subtype BF were observed in 13/186 (7%) cases and BC in 11/186 (6%). HIV-1 *pol* sequences from children and adolescents also showed a predominance of subtype B in 64.5% (20/31), but a significantly higher prevalence of subtype F (26%, 8/31) ( $p=0.005$ ) as compared to adults. Three isolates (9.4%) were subtype BF and one subtype was C.

According to CPR, TDRM was detected in 20/217 (9.2%) isolates, with 65% (16/20) subtype B. TDRM was not

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND LABORATORY DATA BY AGE GROUP

	Adults (n=186)	Children and adolescents (n=31)	Total (n=217)
Age (years)	31 (25–38)	9 (4–14)	29 (22–37)
Male gender [n (%)]	141 (75.8)	15 (48.5)	156 (72)
CD4 cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	496 (354–745)	569 (392–1168)	506 (354–778)
Viral load (log <sub>10</sub> )	4.40 (3.82–4.97)	4.68 (4.43–5.07)	4.52 (3.91–4.99)
HIV risk factor [n (%)]			
MSM/bisexual	92 (49.5)	3 (9.7)	95 (43.7)
Heterosexual male	20 (10.8)	0 (0)	20 (9.2)
WSM	28 (15)	0 (0)	28 (12.9)
Perinatal	0 (0)	13 (41.9)	13 (6.0)
No information	43 (24.7)	15 (48.4)	61 (28.2)
HIV-1 subtype [n (%)]			
B	132 (70.9)	19 (61.2)	150 (70)
F	14 (7.5)	8 (25.8)	22 (10)
C	14 (7.5)	2 (6.5)	16 (7.5)
Recombinant BF	15 (8.0)	2 (6.5)	16 (7.5)
Recombinant BC	11(6.0)	0 (0)	11 (5.0)

Demographic and laboratory characteristics of patients studied by age group. Values are expressed as median (25th–75th IQR) or number of cases (percentage in parentheses). MSM, men who have sex with men; WSM, woman who have sex with men.

observed in subtype C isolates, but was present in subtype F, BC, and BF recombinants. The prevalence of TDRM was higher at the Campinas site (7/44, 16%) compared to the ABCD site (5/99, 5%) ( $p=0.047$ ; if only adults are considered,  $p=0.056$ ). At São Paulo metropolitan area TDRM was 11% (8/74). Mutations to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) were most frequent (4.6%, 10/217), with a higher prevalence of the K103N mutation (43%, 9/21). The prevalence of TDRM to the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) class was 3.6% (8/217) and to the protease inhibitor (PI) class 1.8% (4/217) (Table 2). Two-class resistance was uncommon, and was observed in only two cases (0.9%, one NRTI+PI and one NNRTI+PI, Table 2). When only children or adolescents were considered, only 1/31 (3%) sequences had a CPR-defined mutation.

When we compared previous reported estimates<sup>4</sup> among adults from sites evaluated in this study, we found a non-significant trend in Campinas (15/156, 9.6% in 2009 and 7/44, 15.9% in 2013;  $p=0.3$ ). In the city of São Paulo a significant increase in TDRM prevalence was observed, from 3% (2/69) to 14% (7/50) ( $p=0.03$ ). The ABCD sites had no previous evaluation.

DRMs listed in bold in the IAS list (2014) were found in 37/217 (17%) of HIV-1 sequences, with 3/31 (9.6%) among children and adolescents. Some of these sequences also had other CPR mutations. Most of these non-CPR mutations (60%, 22/37) were associated with newer drugs of the NNRTI class, such as E138A (4.6%, 10/217), V179D/E/L (2.3%, 5/217), and H221Y (0.46%, 1/217). Ten cases presented at least one additional amino acid substitution considered by the GRI-HIVdb.

Regarding the NRTI drug class, a limited impact in susceptibility is expected as we observed an important loss of susceptibility only when two or more mutations were present, with the exception of mutation M184V, which itself confers high resistance to lamivudine. In the protease region some polymorphisms were found (Q58E and K43T) that are associated with low/potential-low resistance to tipranavir, a new generation PI drug. One case exhibited high resistance to

lopinavir with the L76V mutation and another one showed three PI resistance mutations, which conferred resistance to all first generation PI drugs.

## Discussion

Monitoring ART resistance among untreated individuals is an important public health tool, but comparability among studies is subject to different bias that may influence results, as the sampling in geographic areas with an uneventful distribution of TDRM and, equally important, potential heterogeneity among patients' subpopulations.<sup>5</sup> One major factor is the stringency in the exclusion of previously exposed individuals, a problem that does not seem to be trivial when this issue is properly evaluated.<sup>6</sup> We reevaluated clinical information from all cases with detectable resistance mutations to exclude ARV exposure, but we included few cases in which short-term ARV exposure was documented, with none presenting mutations associated with regimens used.

We tried to expand our monitoring by the inclusion of new sites, but we reevaluated previous studied sites, maintaining the recruitment and other inclusion and exclusion criteria as close as possible to a former study from 2009<sup>4</sup> to allow a follow-up evaluation. The new geographic area included here comprised four middle-sized cities (ABCD). This work is the first study including this specific area, which showed a lower TDRM estimate.

Our study demonstrates a TDRM prevalence of 9.2%. Overall, our estimates are similar to those reported from many other studies in Brazil, with intermediate estimates ranging from 5% to 15%.<sup>4,7–9</sup> A study among HIV-infected blood donors in Brazil found a TDRM prevalence of 19.4%, the highest reported in São Paulo,<sup>10</sup> but the confidence interval (CI 95%) for this estimate ranged from 9.5% to 29.2%. TDRM levels higher than 15%, as observed in our study for Campinas, but also with large CI 95%, have been reported in some Brazilian cities, such as Santos and Salvador.<sup>11,12</sup> One of these studies<sup>11</sup> was based on a small sample size (only 47 cases per site) and the other<sup>12</sup> included non-CPR mutations in

TABLE 2. PATIENTS' SEQUENCES WITH DRUG RESISTANCE MUTATIONS

Patient ID	Age/gender	Site	DRM mutation found			Subtype
			NRTI	NNRTI	PI	
BRSP098-12	23/M	ABCD	<i>V106I</i>			F
BRSP147-12	31/F	ABCD	<b>T215I</b> , <i>V106IV</i>			B
BRSP237-12	25/M	Campinas	<b>M184I</b>			B
BRSP249-12	37/M	Campinas		<i>K103N</i>		B
BRSP252-12	32/F	Campinas		<i>V108I</i>		B
BRSP260-12	62/F	São Paulo	<u>K70N</u>			B
BRSP308-12	32/M	Campinas	<u>N/A</u>	<i>N/A</i>	<i>L76V</i>	B
BRSP310-12	31/F	Campinas		<i>K103N</i>		BF
BRSP316-12	31/M	Campinas		<u>V179DE</u>		B
BRSP319-12	29/M	Campinas		<b>K103N</b>		B
BRSP323-12	33/M	Campinas			<i>Q58E</i>	B
BRSP326-12	26/F	Campinas			<i>Q58E</i>	B
BRSP431-12	52/M	Campinas	<i>V106I</i>			F
BRSP433-12	36/F	Campinas	<i>V106I</i>			F
BRSP434-12	51/M	Campinas	<i>V106I</i>			B
BRSP539-12	31/M	São Paulo		<i>Y188H, G190A, H221Y</i>		B
BRSP556-12	19/M	ABCD	<b>T215S</b>			B
BRSP001-13	2/F	ABCD	<u>T69NT</u>			B
BRSP034-13	36/M	São Paulo	<u>V106IV</u>			B
BRSP070-13	21/M	ABCD		<i>K103N, P225H, V179LV</i>		B
BRSP162-13	49/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP257-13	39/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP358-13	11/M	São Paulo		<i>K103N</i>	<i>I85V</i>	F
BRSP489-13	38/M	São Paulo			<i>I85V</i>	B
BRSP574-13	23/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP588-13	0/F	São Paulo	<i>V106IV</i>			F
BRSP616-13	29/M	São Paulo		<u>F227FL</u>		B
BRSP630-13	16/F	São Paulo		<u>E138AE</u>		C
BRSP718-13	32/M	São Paulo		<i>V108I</i>		B
BRSP728-13	20/M	São Paulo		<i>K103N</i>		B
BRSP788-13	39/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP835-13	24/M	ABCD		<i>K103N</i>		B
BRSP864-13	52/M	ABCD		<u>V179D</u>		B
BRSP001-14	6/M	São Paulo	<u>T69N</u>			B
BRSP050-14	42/M	São Paulo		<i>V179D</i>		B
BRSP054-14	32/M	ABCD		<u>E138AE</u>		B
BRSP078-14	25/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP158-14	38/F	São Paulo	<i>M41L, T215D</i>			B
BRSP185-14	28/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP310-14	42/M	São Paulo		<i>V90IV, K101E</i>	<i>I50L, Q58E, V82M, L90M</i>	BC
BRSP339-14	26/M	São Paulo	<b>K219R</b>			BF
BRSP354-14	33/M	ABCD	<u>T69N</u>			B
BRSP395-14	56/F	ABCD			<i>M46IMV*</i>	B
BRSP417-14	35/M	São Paulo			<u>K43T</u>	B
BRSP536-14	27/M	São Paulo		<i>K103N, E138A</i>		B
BRSP554-14	18/M	ABCD			<u>T74S</u>	C
BRSP618-14	54/M	Campinas	<i>M41L, T215V</i>			BF
BRSP627-14	30/M	ABCD		<u>V179D</u>		BF
BRSP648-14	37/M	ABCD		<u>E138A</u>		B
BRSP796-14	38/M	ABCD		<i>K103N</i>		BF
BRSP892-14	56/F	Campinas	<i>M184V</i>	<i>V179T</i>		B

Patients' HIV-1 sequences with one or more drug resistance mutations (DRM) by drug class as NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease gene. N/A, not available; M, male; F, female.

Clinical sites are grouped by geographic areas as São Paulo, ABCD, and Campinas. Aminoacid substitutions listed in CPR (TDRM) as drug resistance mutations are in *bold*, additional DRM listed in the IAS 2014 list are in *italic (bold and italic for those listed in both lists)*, and additional mutations considered at the GRI-HIVdb are underlined.

\*The mutation M46I is a surveillance TDRM according to the CPR list, but the mixture observed (*M46IMV*) was not computed as TDRM when the study sequences were evaluated at the CPR site.

the estimates. However, these cities deserve further attention, especially due to the fact that NNRTI mutations are the most frequently observed, potentially compromising the recommended NNRTI-based first line ART regimen.<sup>18</sup>

Regarding children and adolescents, risk exposure was underestimated due to the lack of proper information, but perinatal exposure was the main route of transmission reported among children. A single patient presented TDRM considered by CPR, which was the K103N mutation, contrasting with studies that show a prevalence varying from 8.7% to 12.8%.<sup>13–16</sup> However, a Brazilian study conducted between 2000 and 2004 evaluated a cohort of 24 children and did not find any TDR.<sup>17</sup> These studies with children are still limited to properly evaluate the prevalence of TDRM in this population.

As expected, subtype B remains predominant while non-B subtypes and recombinants were found at a lower frequency, similar to other observations in the area.<sup>4,7,10</sup> In cities located in the southern part of Brazil the scenario for the epidemic is different, with a predominance of subtype C and CB recombinants. Some studies observed that TDRM seems to be less frequently found among subtype C,<sup>19,20</sup> but the small sample size of non-B subtypes does not allow a proper evaluation of this issue. It is worth noting that subtype C and CB recombinants have attained proportions similar to subtype F and BF recombinants, an increase in the subtype C already observed<sup>21</sup> in other studies.

We reported our TDRM results using CPR to determine prevalence rates, enabling a comparison to other molecular epidemiology studies, but we also evaluated additional DRMs that are considered only by IAS or GRI-Hdb. Some of those mutations may compromise new NNRTIs such as rilpivirine or etravirine, particularly in the E138A mutation. Although not described in previous studies in the country, when we re-analyzed our dataset,<sup>4</sup> we observed that this mutation was already present in some samples, with a similar proportion (E138A 4%, 9/225). The presence of E138A among subtype B sequences in our study, 6.9% (9/130, CI 95% 3.4–12), is somewhat higher than that observed by Sluis-Cremer<sup>22</sup> among subtype B sequences from antiretroviral therapy-naïve patients at large databases (2.3% in the Stanford database and 2% in the British Columbia Centre database), and our findings are actually similar to findings observed in subtype C in these databases (6.1% and 5.9%, respectively).

Lambert-Niclot and colleagues evaluated the prevalence of rilpivirine-associated mutations in a French cohort of 1,729 antiretroviral therapy-naïve patients and found mostly the E138A mutation among non-B subtypes (4.1%, 35/867, versus 2%, 17/862, in subtype B).<sup>23</sup> This mutation seems to be relevant only to the new NNRTI. Etravirine is used in the country only in salvage therapy,<sup>18</sup> a situation in which drug activity may be limited due to class recycling, and the other, rilpivirine, is not yet available through public access. However, the latter is being recommended for first line therapy and evaluated as long-acting nanosuspension formulations that might provide new preexposure prophylaxis strategies (PrEP),<sup>26,27</sup> situations in which our findings may become more worrisome.

## Conclusions

Overall, we observed an increase in TDRM among adults when compared to data from a previous study, but rates are within the range observed in other studies. Children and ad-

olescents show a lower prevalence of TDRM. Continuous monitoring of the situation as well as pretreatment genotyping assessment are necessary, especially taking into account new policies<sup>18</sup> regarding treatment as prevention that are being implemented in the country.

## Sequence Data

Sequences are available at GenBank with accession numbers KPI15360 to KPI15579.

## Acknowledgments

Participants in the São Paulo Salvage Workgroup who contributed to this work included Max Igor Banks Ferreira Lopes, Margareth da Eira, Denise Peluso Pacola, Yu Ching Lian, Roberio Carneiro, Alina Bernardes Habert, Fabio AB Cabral, Lucy Vasconcelos, Paulo Friggi de Carvalho, Raffaella Shimada, Marcina Garcia, Maria Roberta Lopes, Adriane Maira Delicio, and Ana Cláudia Diaz.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant 2011/21958-2].

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- Di Biagio A, Rusconi S, Marzocchetti A, *et al.*: The role of baseline HIV-1 RNA, drug resistance, and regimen type as determinants of response to first-line antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2014;86(10):1648–1655.
- Cambiano V, Bertagnolio S, Jordan MR, *et al.*: Transmission of drug resistant HIV and its potential impact on mortality and treatment outcomes in resource-limited settings. *J Infect Dis* 2013;207(Suppl 2):S57–62.
- Zu Knyphausen F, Scheufele R, Kücherer C, *et al.*: First line treatment response in patients with transmitted HIV drug resistance and well defined time point of HIV infection: Updated results from the German HIV-1 seroconverter study. *PLoS One* 2014;9(5):e95956.
- Ferreira JLP, Rodrigues R, Lança AM, *et al.*: Transmitted drug resistance among people living with HIV/Aids at major cities of São Paulo State, Brazil. *Adv Virol* 2013; 2013:878237.
- Steege K, Demecheleer E, De Cabooter N, *et al.*: A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *J Virol Methods* 2006;133(2):137–145.
- Fogel JM, Wang L, Parsons TL, *et al.*: Undisclosed antiretroviral drug use in a multinational clinical trial (HIV Prevention Trials Network 052). *J Infect Dis* 2013;208(10): 1624–1628.
- Gonzalez CR, Alcalde R, Nishiya A, *et al.*: Drug resistance among chronic HIV-1-infected naïve for use of anti-retroviral therapy in São Paulo city. 2007;129(2):87–90.
- Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MCA, *et al.*: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: A survey of individuals recently diagnosed with HIV. *AIDS Soc* 2009;12:20.
- Sanabani SS, Pastena ÉR, da Costa AC, *et al.*: Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 2011;6(10):e25869.



10. Alencar CS, Sabino EC, Carvalho SM, *et al.*: HIV genotypes and primary drug resistance among HIV-seropositive blood donors in Brazil: Role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;63(3):387–392.
11. de Moraes Soares CM, Vergara TR, Brites C, *et al.*: Prevalence of transmitted HIV-1 antiretroviral resistance among patients initiating antiretroviral therapy in Brazil: A surveillance study using dried blood spots. *J Int AIDS Soc* 2014;17(1):19042.
12. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, *et al.*: High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007;21(2):116–128.
13. Soto-Ramirez LE, Rodriguez-Diaz R, Harris DR, and Hazra R: HIV drug resistance-associated mutations in antiretroviral naïve HIV-1-infected Latin American children. *Adv Virol* 2010;2010:407476.
14. Ferreira FGF, Pinto JA, Kakehasi FM, *et al.*: Prevalence of primary drug resistance-associated mutations among HIV type 1 vertically infected children in Belo Horizonte, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26(2):229–232.
15. Arruda E, Simões L, Sucupira C, *et al.*: Short communication: Intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(2):153–156.
16. Almeida FJ, Rodrigues R, Zapparoli MS, *et al.*: Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations in children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(12):e255–257.
17. Almeida FJ, Berezin EN, Rodrigues R, *et al.*: Diversity and prevalence of antiretroviral genotypic resistance mutations among HIV-1-infected children. *J Pediatr (Rio J)* 2009; 85(2):104–109.
18. Brazilian protocol for ART treatment, accessed in November 5, 2014, available at [www.aids.gov.br/publicacao/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos](http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos).
19. de Medeiros RM, Junqueira DM, Matte MCC, *et al.*: Co-circulation HIV-1 subtypes B, C, and CRF31\_BC in a drug-naïve population from Southernmost Brazil: Analysis of primary resistance mutations. *J Med Virol* 2011;83:1682–1688.
20. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, *et al.*: Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006;116(1–2):201–207.
21. Brígido LF, Ferreira JL, Almeida VC, *et al.*: Southern Brazil HIV type 1C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(3):339–344.
22. Sluis-Cremer N, Jordan MR, Huber K, *et al.*: E138A in HIV-1 reverse transcriptase is more common in subtype C than B: Implications for rilpivirine use in resource-limited settings. *Antiviral Res* 2014;107:31–34.
23. Lambert-Niclot S, Charpentier C, Storto A, *et al.*: Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naïve patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(6):1237–1242.
24. Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, *et al.*: Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(2):284–291.
25. Ferreira JLP, Thomaz M, Rodrigues R, *et al.*: Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: Preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(8): 800–808.
26. Klooster G, Hoeben E, Borghys H, *et al.*: Pharmacokinetics and disposition of rilpivirine (TMC278) nanosuspension as a long-acting injectable antiretroviral formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(5):2042–2050.
27. Rajoli RKR, Back D, Rannard S, *et al.*: Optimisation of intramuscular sustained release nano-formulations using in silico modelling. 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston, MA, March 3–6, 2014. Abstract #518.

Address correspondence to:  
*Luís Fernando de Macedo Brígido*  
 Ave. Dr. Arnaldo 355  
 Virology Center, Retrovirus Laboratory  
 São Paulo 01246-902  
 Brazil  
 E-mail: lubrigido@gmail.com

## **DESCRIÇÃO DE CASOS RELEVANTES DO GRUPO DR**

Abaixo descrevemos com mais detalhes alguns casos que trouxeram peculiaridades ou ilustram aspectos descritos anteriormente.

### **Descrição de caso: Possível transmissão do HIV-1 associada a procedimento de manicure.**

A paciente de 22 anos foi diagnosticada com infecção pelo HIV em 22/01/2013 numa primeira doação de sangue. Surpresa com o diagnóstico, visto que não reconhecia nenhuma situação de risco, demorou seis meses para procurar o SAE de Santo André.

Na sua primeira consulta relatou sua angústia em aceitar o diagnóstico sem antecedente que pudesse justificar a aquisição do vírus. Negou qualquer modalidade de exposição sexual (vaginal, anal ou oral), transfusão de sangue ou hemoderivados, cirurgia, piercing ou tatuagem. Ela tinha há 2 anos um namorado, sem envolvimento sexual, que realizou após o seu diagnóstico, o teste rápido para o HIV com resultado negativo.

O exame ginecológico realizado em agosto de 2014 foi compatível com as afirmações do paciente. Sua mãe confirmou ser sua mãe biológica, foi testada negativa para o HIV, confirmou que a filha nunca havia internado ou tinha recebido hemoderivados na infância, nunca desconfiou de abuso sexual. O paciente negou sintomas, porém no exame físico apresentava candidíase oral. Os exames laboratoriais mostravam uma contagem de plaquetas baixa (115.000/mL), uma baixa contagem de CD4 (11 céls/ mm<sup>3</sup>), e uma carga viral de 64.966 cópias/mL (log 4,81). Demonstrando ter um perfil de uma infecção crônica adquirida há anos.

Como o paciente não tinha uma via de transmissão esclarecida, as possíveis maneiras de transmissão foram apresentadas. A paciente lembrou-se, e sua mãe confirmou, que aproximadamente há 10 anos, na ocasião com 12 anos, a prima fez as suas unhas, com os instrumentos de

manicure que trouxera. Posteriormente soube ser a prima portadora do HIV. Esta (putativo caso-índice, PIC) era manicure como profissão, costumava ir semanalmente fazer as unhas da tia, e por algumas raras ocasiões fez as unhas da prima.

A PIC é paciente na mesma clínica, e foi convidada a comparecer com a prima numa próxima consulta. Aos 36 anos de idade, relatou ter sido diagnosticada há 17 anos durante sua terceira gravidez, recebeu antirretrovirais (zidovudina e lamivudina) até o parto, abandonou seguimento após o parto, dados confirmados no prontuário. PIC permaneceu sem tratamento por aproximadamente 5 anos (1997-2003), período que incluía o possível evento de transmissão. PIC negou lembrar do evento especificado pela paciente. As primas negaram a possibilidade de terem tido um parceiro/abuso sexual em comum. PIC provavelmente foi contaminada pelo pai de seu terceiro filho, com quem ela não tinha um relacionamento estável, e não convivia no ambiente familiar, corroborando com a baixa probabilidade de abuso sexual, ditas pela paciente e sua mãe. Em 2003, PIC retomou seguimento gestante, já no sexto mês de sua quarta gravidez. Sua primeira carga viral coletada após 10 dias da reintrodução antirretroviral foi de 7530 cópias/mL (log 3,88).

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, as amostras biológicas das duas pacientes foram obtidas e processadas em ocasiões distintas no laboratório de retrovírus do Instituto Adolfo Lutz/SP. Ambas as pacientes tiveram DNA a partir de células e RNA a partir de plasma extraídos por reação em cadeia da polimerase, e amplificados em procedimentos distintos, com as regiões *env* e *pol* sequenciados.

PIC não tinha carga viral detectável na amostra coletada de plasma, o material genético do HIV (DNA proviral) foi amplificado e sequenciado, com as sequências de HIV obtidas a partir de células. As análises filogenéticas das sequências de *pol* e de *env* do HIV de ambas pacientes revelou serem sequências altamente relacionadas, com uma identidade de nucleotídeos emparelhados de 0,966% em *pol* e de 0,948% em *env* (0,914% considerando lacunas/inserções). O subtipo viral foi B. A avaliação de *pol* na

base de dados *Stanford* mostram um padrão de mutação semelhante. Ambas as pacientes tinham um tropismo CCR5 (*geno2pheno* taxa de 21% de falso-positivo para o caso e 39% para PIC). A data estimada do ancestral comum (cerca de 11 anos atrás) correspondeu ao período referido do compartilhamento dos instrumentos de manicure, numa ocasião em que PIC não estava em supressão viral, conforme descrito por Matsuda e col. (Matsuda et al., 2014b).

Embora seja muito difícil determinar os eventos ocorridos há cerca de uma década, a parafernália de cosméticos foi a única via de transmissão associando a presença de um vírus com um ancestral comum entre as primas, que possuem as regiões do envelope e da polimerase do HIV fortemente relacionadas por parâmetros filogenéticos. A paciente evoluiu mantendo carga viral não detectada e CD4 de 427 céls/mm<sup>3</sup> na última coleta em 01 de setembro de 2015, no primeiro esquema antirretroviral com TDF/3TC/LPVr.

## **Descrição de caso: Controlador de Elite Agudo**

O paciente masculino de 29 anos, HSH, costumava fazer exames de HIV regularmente. Em 22/01/2014 procurou o Serviço de Atendimento Especializado – CECI em São Paulo, capital, onde realizou TRD HIV com resultado negativo e VDRL com resultado de 1:512, recebeu penicilina benzatina 2.400.000 UI semanais, por 3 semanas. Em 12/02/2014, 23 dias após o exame anterior de TRD HIV negativo, realizou TRD no CRT DST/AIDS e sorologia por quimiluminescência e imunoblot positivos no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, ambos com resultado positivo, documentando a conversão sorológica. Em 21/02/2014 colheu no laboratório Delboni Auriemo carga viral do HIV abaixo do limite de detecção de 40 cópias/mL e CD4 com 1308 céls/mm<sup>3</sup>, repetido após 18 dias em 11/03/2014, no Instituto Adolfo Lutz/SP com resultado de carga viral não detectada e CD4 de 1920 céls/mm<sup>3</sup>. Após 3 meses do diagnóstico da sífilis latente realizou exame do líquido cefalorraquidiano que foi normal e sorologia para o HTLV I-II não reagente. Manteve carga viral não detectada em exames subsequentes, por um período superior a 335 dias, assim como CD4 estável (1911 céls/mm<sup>3</sup> na última coleta em 13/01/2015). No seguimento o VDRL apresentou queda progressiva dos títulos, com último exame com resultado de 1:2 em 13/01/2015. Em relação ao primeiro exame de CD4 o paciente apresentou um ganho de 600 céls em 18 dias, que se manteve até a última coleta avaliada (CD4 de 1920 céls/mm<sup>3</sup> e carga viral não detectado em 01 de setembro de 2015), coerente com a fase aguda da infecção pelo HIV na qual se encontrava. Em março de 2015 apresentou quadro de dengue, com confirmação sorológica por ELISA IgM, realizado no IAL de Santo André, esta amostra posteriormente foi submetida a carga viral e tentado genotipagem em célula, paciente permaneceu avirêmico mesmo na fase aguda da infecção da dengue, e a tentativa de genotipagem não obteve êxito. Este é um exemplo de um controlador de elite, que nunca foi virêmico, inclusive na soroconversão.

## **Descrição de caso: Caso de resistência transmitida com rápida evolução de resistência ao Tenofovir**

O paciente masculino de 52 anos foi admitido no SAE em 9/12/2013, após ter realizado no CTA um TRD positivo. Tem antecedente de relações sexuais somente com homens, porém sem vida sexual ativa há 1 ano. Referiu exame de HIV há 2 anos negativo. Há 7 meses iniciou manchas na pele, emagrecimento de 14 kg em 3 meses e drenagem purulenta anal. Há 2 meses (2/10/2013) realizou biópsia de pele com resultado do anatomopatológico compatível com líquen simples crônico ulcerado. Na mesma ocasião fez os seguintes exames laboratoriais: VDRL ½ e Quimiluminescência com micropartículas (CMIA) reagente, sorologia toxoplasmose não reagente, hepatite A imune, Hepatite B imune por infecção prévia (HBsAg não reagente, anti-HBs e anti-HBc reagentes), hepatite C não reagente, citomegalovírus IgG reagente, colesterol total de 105 mg/dL, triglicérides de 214 mg/dL, hemoglobina de 11,4 g/dL e hematócrito de 36%. Em 10/12/2013 colheu exames e sintomático foi avaliado em seguida, no mesmo dia. Ao exame físico apresentava-se emagrecido com lesões maculares acastanhadas e drenagem purulenta anal. Pela gravidade optou-se por início TARV (TDF/3TC/EFV), ciprofloxacina por 14 dias por abscesso perianal e profilaxia primária para micobacteriose atípica, pneumocistose e neurotoxoplasmose, com azitromicina e sulfametoxazol-trimetoprim, antes dos resultados. No primeiro retorno em 20/12/2013 foi verificado o resultado do exame colhido em 10/12/2013 com CD4 de 44 céls/mm<sup>3</sup>, paciente tolerava a medicação e evoluía melhor. Em 21/01/2014 atendeu a convocação devido resultado da genotipagem de 10/12/2013, colhida no dia da introdução dos ARV, com mutação L10I na protease (polimórfica, reduz susceptibilidade inibidor de protease ou aumenta a replicação do vírus com outras mutações de resistência), V90IV e V179D na transcriptase reversa (conferem alguma resistência aos não análogos, pontuando no algoritmo de *Stanford*: EFV 10, NVP 10, ETR 5, RPV 5). A carga viral da admissão era de 3.038.794

cópias/mL 6,48  $\log_{10}$ . O subtipo viral foi B (PR 92,6%/ RT 93,4%). O efavirenz foi substituído por LPV/r e mantido TDF/3TC, neste dia em uso de ARV há 42 dias havia recuperado 16kg.

Realizou uma segunda coleta de exames em 28/01/2014, após 49 dias da primeira genotipagem e do início do TARV, com resultado nesta segunda genotipagem com presença das mutações K65R (confere resistência de nível intermediário a alta ao TDF, DDI, D4T e ABC (2 a 3 vezes de redução de susceptibilidade) e baixa a intermediário ao 3TC e FTC (5-7 vezes de redução de susceptibilidade), aumenta a susceptibilidade a AZT) e G190S (mutação não polimórfica que provoca resistência de alto nível para NVP e EFV (> 50 vezes susceptibilidade reduzida), tem um peso de 1,5 na pontuação Tibotec ETR de susceptibilidade genotípica, mas não parece ser selecionados por ETR ou RPV), não apresentadas na primeira genotipagem e rapidamente adquiridas, mesmo em uso regular de ARV, além da manutenção das mutações prévias: V90I, V179D e L10I. No mesmo dia da coleta da segunda genotipagem fez os exames de seguimento com os respectivos resultados: CD4 de 251cél/mm<sup>3</sup> (ganho de 207 células), carga viral de 3.857 cópias/3,586  $\log_{10}$  (queda de 2,90  $\log_{10}$ ), colesterol total de 162 mg/dL e triglicérides de 396 mg/dL. Realizado nova troca, agora do TDF pelo AZT em 9/4/2014, diante do resultado da segunda genotipagem.

Em 03/06/2014 a carga viral era não detectada, o de CD4 317 células/mm<sup>3</sup> e os triglicérides de 558 mg/dL, prescrito ciprofibrato, usou por 30 dias. Paciente retomou as atividades, sentindo-se muito bem. Na última avaliação laboratorial em 15 de setembro de 2015 evoluiu com carga viral não detectada e CD4 295 células/mm<sup>3</sup>.

## **Descrição de 5 casos agudos com síndrome retroviral aguda na admissão no serviço**

### **Caso 1 (outubro de 2011)**

O paciente masculino de 22 anos, com antecedente de ser HSH, foi admitido no SAE em 11/10/2011. Apresentou febre e dor de garganta intensa, que não melhoraram após 3 dias de uso de anti-inflamatório e amoxicilina, estes sintomas iniciados há cerca de um mês (10/09/2011) da admissão no SAE. Referiu exposições sexuais desprotegidas recentes. Ao exame físico em 13/09/2011 apresentava hiperemia de orofaringe e discreto exantema. Em 15/09/2011 colheu amostra para sorologia anti-HIV (ELISA de terceira geração) com resultado indeterminado. Em 22/09/2011, com 12 dias de história, a carga viral foi de 2.160.000 cópias/mL  $6,33 \log_{10}$  e CD4 de 152 céls/mm<sup>3</sup>, hepatite B com imunidade vacinal, anti-HCV não reagente. O subtipo foi o B (PR 94,3% / 95% RT), o índice de avidéz foi 0,00 e a genotipagem não apresentava mutações de resistência. Foi considerado incidente no teste de avidéz. Iniciou TARV com AZT/3TC/LPVr em 31/10/11, fazendo uso regular por 2 meses. O paciente acreditava ser intolerante a combinação AZT/3TC, com sintomas inespecíficos, sendo substituído por TDF/3TC e mantido o LPVr em 13/03/2012, fez uso por 30 dias. Teve 4 genotipagens colhidas até 31/07/2012 sem mutações de resistência. Em 01/08/2012 foi feita nova tentativa de reintrodução do último esquema ARV (TDF/3TC/LPVr), seguido de coleta de nova genotipagem. Esta após cerca de 2 meses (09/10/2012) com uso irregular de ARV mostrou a presença da mutação de resistência V75IV na transcriptase reversa, que confere baixo potencial de resistência ao D4T e ao DDI, pontuando na escala de *Stanford*: 5 para 3TC, 10 para D4T, 10 para DDI e 5 para FTC. Visando melhor adesão, em 10/12/2012 o LPVr foi trocado por ATZ/RTV e mantido o TDF/3TC. Evoluiu mantendo carga viral < 40 cópias/mL e CD4 de 643 céls/mm<sup>3</sup> na última avaliação em 25 de agosto de 2015.



## Caso 2 (janeiro de 2012)

O paciente masculino de 21 anos, admitido em 30/01/2012 no SAE, oriundo do Pronto Socorro Central de Santo André, onde permaneceu em observação por 5 dias, de 23 a 28/01/2012, devido leucopenia febril. Apresentava história de 10 dias de febre, mialgia, cefaleia e diarreia no início do quadro em 13/01/2012, refere ter feito exame de dengue que foi negativo. No dia 25/01/2012 apresentou o valor mais baixo do leucograma durante este período, com 1600 leucócitos/mm<sup>3</sup>, foi dispensado do pronto socorro quando não mais apresentava febre. Na admissão no SAE, sentia-se bem e ao exame clínico apresentava adenomegalia cervical, occipital e axilar assimétrica, no dia seguinte evoluiu com exantema discreto no momento da coleta de sorologias para síndrome da mononucleose. Devido este novo sintoma a enfermeira pediu nova avaliação médica e a dosagem de carga viral foi incluída, pois questionado quanto a exposição de risco ao HIV, referiu relação homossexual desprotegida 20 dias antes do início dos sintomas, em final de dezembro de 2011. Exames laboratoriais de 01/02/2012 mostraram uma carga viral do HIV acima do limite de detecção de 750.000 cópias/mL, sorologia CMV IgM reagente e IgG não reagente, anti-HCV não reagente, anti-VHA não reagente, HTLV I-II não reagente, hepatite B com imunidade vacinal, VDRL/TPHA não reagente e sorologia para toxoplasmose IgG reagente e IgM não reagente. O subtipo viral foi B: *PR: B (96.0%) e RT: B (95.8%)*, o índice de ambiguidade foi 0,00, a genotipagem não apresentava mutações de resistência. O primeiro CD4 foi colhido em 29/02/2012 com resultado de 571 céls/mm<sup>3</sup>. Em 24/03/2012 iniciou ARV (TDF/3TC/EFV), cerca de 70 dias após a Síndrome Retroviral Aguda. Em 03/04/2012 após 10 dias do início do ARV, compareceu ao serviço devido exantema pouco pruriginoso com 1 dia de evolução, que melhorou com o uso de loratadina, sífilis foi descartada e o paciente manteve o mesmo esquema ARV. O primeiro exame de seguimento em uso de ARV foi coletado em 28/12/2012, após cerca de 9 meses da introdução

da terapia ARV, com carga viral abaixo do limite de detecção de 50 cópias/mL. O primeiro controle de CD4 pós-tratamento ARV foi colhido em 20/03/2013 com resultado de 1203 céls/mm<sup>3</sup>. Na última coleta em 04 de agosto de 2015 apresentava CD4 1446 céls/mm<sup>3</sup> e carga viral não detectada, mantendo-se aderente ao primeiro esquema ARV.

### **Caso 3 (fevereiro de 2013)**

A paciente feminina de 32 anos, heterossexual, admitida em 01/03/2013 no SAE, oriunda da Santa Casa de Mauá, onde permaneceu internada por 8 dias, inicialmente por suspeita de meningite, devido cefaleia iniciada há 2 semanas, com piora progressiva. Na primeira semana dos sintomas apresentou febre, faringite e adenomegalia cervical, procurou pronto atendimento e foi medicada com amoxicilina, evoluiu afebril, com exantema no nono dia após o início da sintomatologia. O exantema estava presente na internação e foi considerado inicialmente uma farmacodermia. Ao exame clínico encontrava-se febril com 37,8 °C, com rigidez de nuca discreta, discreto exantema e micropoliadenomegalia cervical. O exame do líquido foi normal, hemograma com hemoglobina de 11,6 g/dL e hematócrito de 34,8%. Nos exames de imagem a tomografia computadorizada de crânio e o ultrassom de abdome total foram normais. A paciente amamentava um lactente de 5 meses, tendo feito sorologia HIV no pré-natal e teste rápido diagnóstico (TRD) HIV no pré-parto, negativos. Mantinha relacionamento sexual com o mesmo parceiro há 1 ano, com relação sexual sem proteção no pós-parto, inclusive 3 semanas antes do início da sintomatologia, referindo que o mesmo nunca fez exame do HIV. Internada há 3 dias e no 18º dia do início dos sintomas compatíveis com Síndrome Retroviral Aguda em 25/02/2013, foi realizado novo TRD negativo, e colhido amostra para carga viral do HIV, encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz/São Paulo, com resultado

em 3 dias acima do limite de detecção (500 000 cópias/mL). O subtipo viral foi B: *PR: B (94.3%) e RT: B (95.1%)*, o índice de ambiguidade foi 0,09, o teste de avidéz foi inconclusivo e a genotipagem não apresentava mutações de resistência.

O aleitamento do lactente de 5 meses foi suspenso, na suspeita da infecção aguda materna, no dia da coleta da carga viral do HIV. Após confirmação da infecção materna foi realizado TRD (negativo), coletado carga viral do HIV (não detectado) do lactente, e no mesmo dia foi prescrito para mãe e filho (01/03/2013) AZT/3TC/LPVr. Após 5 dias da introdução antirretroviral foi feito contato telefônico com a paciente, que referiu uso regular da medicação e que havia descontinuado após 3 dias o tratamento do lactente por vômitos; reforçada a importância da adesão ao tratamento, paciente referiu retomar a administração ao lactente e assim afirmou em contatos telefônicos posteriores. Pós 3 semanas do diagnóstico materno, o lactente repetiu carga viral mantendo resultado indetectável, confirmado por sorologia após 3 meses. A mãe fez uso dos antirretrovirais por 30 dias e suspendeu devido convicções religiosas, retomando após 45 dias. Na consulta em que foi reintroduzido a medicação trouxe os frascos do antirretroviral do lactente, ou seja, apesar de ter referido administração regular o lactente deve ter recebido a medicação apenas por três dias. A mãe fez uso de ARV por um mês, abandonou o uso por 45 dias, por convicções religiosas, sendo reintroduzido, manteve-se aderente. Após 33 dias do início do ARV a carga viral materna estava em 238 copias/log<sub>10</sub> 2,377, pós 76 dias houve elevação da carga viral no abandono do tratamento para 4847 copias/log<sub>10</sub> 3,685, evoluindo não detectada desde 07/08/2013, 5 meses após o diagnóstico do HIV agudo, com CD4 de 787 céls/mm<sup>3</sup>. Na última coleta em 17 de junho de 2015 manteve viremia não detectada no primeiro esquema ARV. Este relato de caso foi apresentado (oral) como Discussão de Caso no 18º Congresso Brasileiro de Infectologia; 2013, 31 agosto a 4 de setembro; Fortaleza. Brasil.

#### **Caso 4 (maio de 2014)**

O paciente masculino de 37 anos, com antecedente de ser HSH, foi admitido no SAE em 30/05/2014, oriundo do Hospital Beneficência Portuguesa de Santo André onde permaneceu internado por 15 dias. Os sintomas de febre e cefaleia começaram em 14/05/2014, inicialmente foi suspeitado dengue, a qual não foi confirmada (sorologia IgG e IgM não reagentes). Posteriormente diagnosticado com meningite linfomonocitária (líquor de 25/5/2014 com 120 células/mm<sup>3</sup>, 85% linfócitos, 15% monócitos, proteínas totais de 82 mg% (<40), cloretos, glicose e ureia normais, reações de globulinas Pandy, Nonne positivas, VDRL e hemaglutinação para sífilis negativo, microbiológico negativo para flora bacteriana, BAAR e fungos, cultura negativa) e infecção pelo HIV (ELISA de quarta geração de 23/05/2014). No exame físico na admissão no SAE (30/05/2014) estava com febre de 38°C e hiperemia de orofaringe.

Durante a internação, em 03/6/14 realizou os exames de TGP 101 U/L (10-49), TGO 42 U/L (<34), GGT 285 U/L (<73), mononucleose não reagente, VDRL e hemaglutinação para sífilis não reagente, toxoplasmose IgG reagente IgM não reagente anti-HCV não reagente, hepatite B negativo (anti-HBs, anti-HBc e HBsAg).

Tinha antecedente de sorologia para o HIV negativa em doação de sangue em 2012. Tem parceiro fixo há 3 anos, não testado para o HIV. Após o diagnóstico do HIV, ainda com sintomas de Síndrome Retroviral Aguda, em 03/06/2014 apresentou CD4 de 322 céls/mL e carga viral de 3.329.942 cópias/mL log<sub>10</sub> 6,52. Na genotipagem o subtipo foi B: *PR*: 90,9% e *RT*: 95,4%, na protease apresentou a mutação L10I, um polimorfismo, uma mutação acessória que reduz a susceptibilidade a inibidor de protease ou aumenta a replicação viral, quando associada a outras mutações de resistência. Na transcriptase reversa apresentou a mutação E138A, uma comum mutação acessória polimórfica para não análogos, selecionada em pacientes recebendo etravirina e *rilpivirine*, reduzindo a suscetibilidade em duas vezes, com um peso de 1,5 na escala Tibotec de suscetibilidade da

etravirina. No score de *Stanford* pontua 10 para a etravirina e 15 para a rilpivirine. O índice de ambiguidade foi 0,00. O teste de avidéz foi considerado incidente.

Evolui em 6/6/2014 afebril e em 16/6/2014 iniciou o tratamento ARV com AZT/3TC/LPVr. Após cerca de 100 dias do início da TARV (24/09/2014), apresentou carga viral de 87 cópias/mL  $1,94 \log_{10}$  e CD4 418 céls/mm<sup>3</sup>. No seguimento manteve carga viral <40 cópias/mL e CD4 766 céls/mm<sup>3</sup> na última coleta em 17 de junho de 2015 em uso do primeiro esquema.

### **Caso 5 (novembro de 2014)**

O paciente masculino de 26 anos, com antecedente de ser HSH, foi admitido em 21/11/2014 no SAE. Anteriormente havia procurado o CTA do mesmo ambulatório em 02 de junho de 2014, assintomático, com resultados de VDRL 1/32 e TPHA positivo, HIV negativo, hepatite B com imunidade vacinal, sendo medicado com penicilina benzatina por 3 semanas. Em 16/11/2014, 4 dias antes da admissão, apresentou febre no primeiro dia, um episódio de vomito, dor de garganta, cefaleia retro orbital e mialgia de panturrilhas por 3 dias.

Referiu relação sexual homossexual há 3 semanas do início da sintomatologia, com uso de preservativo durante todo o ato sexual, exceto na exposição oral.

No exame físico na admissão apresentava adenomegalia cervical bilateral e discreta hiperemia de orofaringe. Na evolução apresentou aftas em palato mole após 2 dias.

A carga viral colhida em 25/11/2014, após 6 dias do TRD HIV negativo, teve resultado acima do limite de detecção de 10 milhões de cópias/mL. Nesta amostra o subtipo viral identificado foi B: *PR* (93,5%) e *RT* (94,1%) e não apresentava mutações de resistência. O teste de avidéz foi considerado incidente. O esquema ARV com TDF/3TC/EFV foi introduzido

em 28/11/2014, referiu tonturas apenas nos dois primeiros dias, não descontinuando a medicação. O exame de VDRL colhido em 21/11/2014 foi de 1/8. Em 09/12/2014 mantinha VDRL 1/8 e sorologias HTLV I-II, toxoplasmose, hepatite C não reagentes, sorologia citomegalovírus com IgG reagente e IgM não reagente, imunidade vacinal a hepatite B (anti-HBs isolado de 480,2 UI/mL), CD4 de 244 céls/mm<sup>3</sup> com carga viral de 3186 log<sub>10</sub> 3,50, 12 dias após o início do tratamento ARV. No seguimento manteve aderente ao primeiro esquema ARV, com CD4 de 581 céls/mL e carga viral de não detectada na última coleta em 01 de setembro de 2015.

## An HIV-1 Transmission Case Possibly Associated with Manicure Care

Elaine Monteiro Matsuda,<sup>1</sup> Luana Portes Ozório Coelho,<sup>2</sup> Victor Figueiredo Pimentel,<sup>3</sup>  
Humberto Barjud Onias,<sup>1</sup> and Luís Fernando de Macedo Brigido<sup>2</sup>

### Abstract

A recently diagnosed 22-year-old female with no history of transmission risk factors prompted a thorough investigation of possible alternative risk factors. As the patient had evidence of advanced disease and laboratory data compatible with long-standing infection, past events were reviewed. About 10 years ago the patient shared manicure utensils with an older cousin, later known to be HIV infected; this prompted the phylogenetic analysis of the HIV sequences of both patients. Phylogenetic analyses of partial HIV-1 polymerase and envelope sequences from both patients revealed highly related sequences, with an estimated common ancestor date (about 11 years ago) that coincided with the putative sharing of manicure instruments, during a time in which the cousin was not virally suppressed. Taken together, the information about the infection of this patient suggests the use of shared manicure instruments as an alternative route of fomite HIV-1 transmission.

**T**HE CONCEPT THAT PARAPHERNALIA may mediate HIV acquisition is not new,<sup>1</sup> but with the ubiquity of sexual activity, the major driver of new infections, alternative, non-classical modes of transmission may be overlooked. Body fluids, especially blood, can contaminate different instruments and lead to fomite transmission. Among potential sources, negligence in using beauty instruments such as needles for tattooing and razors may increase viral transmission, especially hepatitis C.<sup>2</sup> Even when safe practices are enforced at the work environment, home use of these tools may represent a risk, as some decontaminating steps may not be enforced. We describe a case of HIV infection potentially related to the use of cuticle scissors or other manicure care instruments.

A 22-year-old Brazilian woman, diagnosed with HIV infection after a first blood donation, was evaluated at the HIV/AIDS outpatient clinic, Santo Andre Infectious Diseases Ambulatory, Brazil. The patient (case) denied vaginal, anal, or oral sexual intercourse, blood transfusion, surgery, piercing, or tattooing. She had a boyfriend (seronegative by rapid check HIV test) for 2 years, but still had not engaged in sexual intercourse (a gynecological examination in August 2014 is compatible with the patient's statements). Her mother (seronegative by rapid check HIV test) confirmed that she was her biological mother and that the patient had never used blood products in childhood and had never suffered sexual violence. The patient reported no symptoms, but physical

examination revealed oral candidiasis. She had an otherwise normal laboratory workup except for a low platelet count (115,000/ml), a low CD4 count (11 cells/mm<sup>3</sup>), and a viral load of 64,966 copies/ml (log 4.81).

Fluconazol and lamivudine/tenofovir/lopinavir/ritonavir were introduced. As the patient had no apparent transmission risk factor, a comprehensive review of all possible HIV acquisition routes was discussed independently by three attending physicians during subsequent visits. The only plausible mode of transmission was associated with events, about 10 years ago, when she remembered that at the age of 12 she used manicure instruments, including cuticle scissors, from an HIV-infected cousin. At that time the family did not know about the cousin's HIV infection. The cousin (putative index case, PIC) is a patient at the same clinic. She is a female manicurist, age 36 years, who was diagnosed 17 years ago during her third pregnancy. After she was diagnosed with HIV she used zidovudine and lamivudine until delivery, but was subsequently lost from follow-up. PIC remained without treatment for 5 years (1997–2003), a period that included the time of the putative transmission event. PIC did not remember any specific sharing event, but the case and her mother confirmed the occasional use of PIC's manicure instruments at home. Any other plausible risk, including any kind of relationship with a third party, as a common male partner, was denied. PIC was probably contaminated by the

<sup>1</sup>Santo André Aids Program, São Paulo, SP, Brazil.

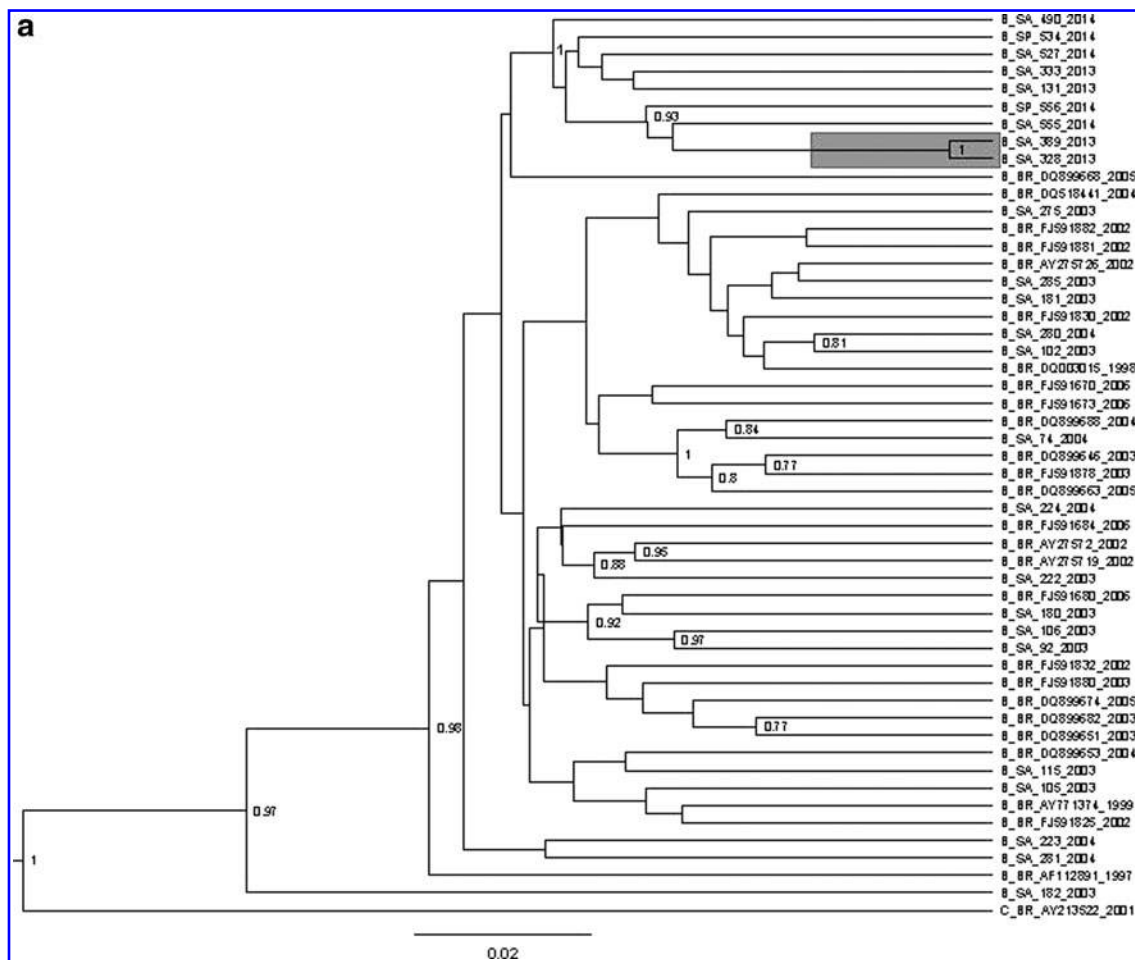
<sup>2</sup>Retrovirus Laboratory, Virology Center, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

father of her third child, with whom she did not have a stable relationship. He did not partake of the family environment, making the possibility of sexual abuse unlikely, in agreement with the patient's and her mother's statements.

In 2003, PIC started zidovudine/lamivudine/nevirapine during her fourth pregnancy. Her first viral load, tested 10 days into treatment, was 7,530 copies/ml (log 3,88); it remained below the limit of detection until March 2008, when due to virological failure associated with irregular use of therapy, tenofovir/lamivudine/atazanavir/ritonavir was introduced. PIC has maintained undetectable viremia until her last evaluation in 2014.

Biological material was obtained after informed consent on separate occasions from both patients and processed and evaluated at the retrovirus laboratory, Adolfo Lutz Institute. Both patients had DNA from cell and RNA from plasma extracted and polymerase chain reaction (PCR) amplified in separate procedures, with the *env* and *pol* regions sequenced as previously described<sup>3,4</sup> (Supplementary Methods; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/aid](http://www.liebertpub.com/aid)). PIC was undetectable at the time and only cell-associated HIV genetic material (proviral DNA) was amplified and sequenced, with HIV sequences obtained from cell and plasma for the case. Phylogenetic analyses of the *pol* and *env* sequences from both patients revealed highly related HIV



**FIG. 1.** Phylogenetic trees of HIV-1 genome segments *pol* PR/RT (~780 pb) and *env* c2-v3 (~500 pb). B-Markov Chain Monte Carlo (MCMC) phylogenetic trees were constructed using the GTR + I +  $\Gamma$  model, based on four independent MCMC runs of four chains each, run for 20 million generations, combined using LogCombiner after the consensus tree was obtained with TreeAnnotator. (a) Fifty-two sequences from HIV-1 subtype B were analyzed along with one subtype C, used to root the tree. Sequences included those obtained from the two study patients, from available sequences from the same clinical service (SA), from other areas in São Paulo (SP), and from other Brazilian sequences at GenBank (BR). Sequences are coded as subtype (B or C), place of isolation, laboratory or GenBank number, and date of collection. Sequences from study patients are highlighted by a gray box. The tree was rooted using one HIV subtype C sequence (AY213522). [Only key nodes with a high (>0.70) posterior probability (PP) support are displayed on the tree.] (b) Available subtype B partial envelope sequences from Brazil at GenBank along with HIV-1 B sequences from study patients and sequences from other patients from the same city (SA) were named and analyzed as described above. Moreover, we estimated the time of the most recent common ancestor (TMRCA) under a Bayesian skyline coalescent tree, which is shown for the main nodes. The rectangle, highlighted in gray, represents the sequences of both study patients, with a high PP (1.0), and an estimated common ancestor date about 10.81 years ago. The tree was rooted using two HIV-1 subtype C reference sequences (AB254149 and AY727523).



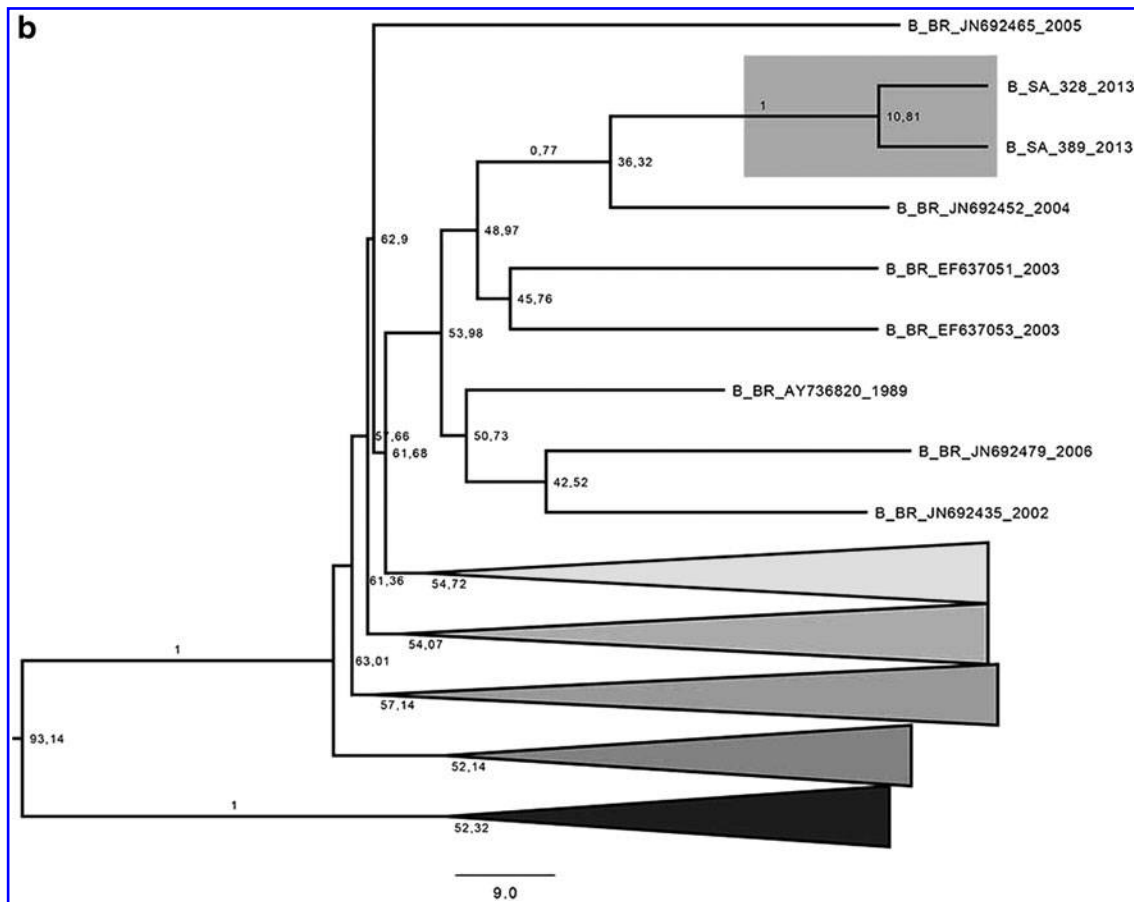


FIG. 1. (Continued).

sequences, with a pairwise nucleotide identity of 0.966% at *pol* and of 0.948% at *env* (0.914% considering gaps/insertions). Evaluation of *pol* at the Stanford database shows a similar mutation pattern, but some additional mutations at the PIC sequence predicted a low level resistance to nelfinavir and saquinavir and potential low level resistance to atazanavir and indinavir. The mutations identified in both patients at protease included L33I, R41K, I64V, H69Y, V77I, and I93L and at reverse transcriptase (RT) I50V, K122E, and E169D. No additional mutations were observed in the case at protease, with K20R, K22R, and F214 at RT. In PIC, G73S and G86R were additionally observed at protease and at RT M41I, K49R, and R211K. Both patients had a predicted CCR5 only tropism (geno2pheno false-positive rate of 21% for the case and 39% for PIC).

Figure 1 depicts phylogenetic trees, constructed using BEAST v1.7.4, under the GTR+I+ $\Gamma$  model (Fig. 1a polymerase and Fig. 1b envelope). Four Markov Chain Monte Carlo (MCMC) runs were done independently; each MCMC run was 20,000,000 generations and was resampled every 2,000 generations. The runs were combined using LogCombiner after the consensus tree was obtained with TreeAnnotator. Trees were rooted with HIV-1 subtype C reference.

A representative *pol* phylogenetic tree was built using study cases and available sequences from naive and treated HIV-infected individuals followed at the same clinic, along with sequences from other areas of São Paulo and GenBank

references (Fig. 1a). To trace the lineage of patients' sequences back in time, we evaluated *env* sequences with B-MCMC,<sup>5</sup> along with available subtype B envelope sequences from Brazil at GenBank covering position 6,800 to 7,500, excluding clones. Available HIV sequences obtained from other patients at the same clinic were also included, along with two subtype C references to root the tree (Fig. 1b). The estimated common ancestor date (about 11 years ago) corresponds to the period of the referred sharing of manicure instruments, a time when PIC was not virally suppressed. Sequences are available at GenBank with accession numbers KM360099 to KM360119 and KM489108 to KM489123.

With the phylogenetic data on hand, the case and PIC were further interviewed and the epidemiological data were confirmed. Although it is very difficult to determine the course of events occurring a decade ago and to guarantee that the use of the cosmetic paraphernalia was actually the mode of transmission, the HIV envelope and polymerase regions from both women are strongly related by phylogenetic parameters, and no alternative mode of transmission was identified. In a recent case of transmission among women, the CDC lists, along classical transmission routes, potential alternative sources that must be ruled out, such as tattooing, acupuncture, piercing, the use of shared sex toys between the partners and other persons, and exposure to body fluids,<sup>6</sup> but does not include manicure instruments. Our case raises the potential role of an additional fomite-related route of transmission of HIV-1.

**Acknowledgment**

Supported by FAPESP 2011/21958-2.

**Author Disclosure Statement**

No competing financial interests exist.

**References**

1. Shah SM, Shapshak P, Rivers JE, *et al.*: Detection of HIV-1 DNA in needle/syringes, paraphernalia, and washes from shooting galleries in Miami: A preliminary report. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1996;11(3):301–306.
2. Painsil E, Binka M, Patel A, *et al.*: Hepatitis C virus maintains infectivity for weeks after drying on inanimate surfaces at room temperature: Implications for risks of transmission. *J Infect Dis* 2014;209(8):1205–1211.
3. Ferreira JL, Coelho LP, Rodrigues R, *et al.*: Evaluation of genotypic prediction of HIV-1 tropism using population sequencing of replicates. *J Virol Methods* 2012;179(2):325–329.
4. Ferreira JL, Thomaz M, Rodrigues R, *et al.*: Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: Preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(8): 800–808.
5. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, and Rambaut A: Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 2012;29(8):1969–1973.
6. Chan SK, Thornton LR, Chronister KJ, *et al.*: Likely female-to-female sexual transmission of HIV—Texas. *MMWR* 2012;63(10):209–212.

Address correspondence to:  
*Luís Fernando de Macedo Brígido*  
*Retrovirus Laboratory*  
*Virology Center*  
*Adolfo Lutz Institute*  
*Ave. Dr. Arnaldo 355*  
*São Paulo 01246-902*  
*Brazil*

*E-mail: lubrigido@gmail.com*

**Considerações sobre mutações de resistência segundo o algoritmo de análise de resistência de Stanford (*Stanford HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm – GRI, Version 7.0, last updated 02/27/14*), encontradas na genotipagem de admissão.**

**Considerações sobre as mutações encontradas na PR (protease):**

**T74S:** A T74S é uma mutação secundária de resistência para inibidor de protease, confere baixa resistência ao NFV, não mais no arsenal terapêutico e confere pontuação 15 na escala de *Stanford*.

**M46IMV:**

**M46I:** Mutação primária de resistência para inibidor de protease, confere baixo nível de resistência ao NFV (pontua 20 na escala de *Stanford*), potencial baixo nível de resistência a ATV/r, FPV/r, IDV/r e LPVr, pontuando 10 na escala de *Stanford*.

**M46V:** A M46V é uma rara mutação secundária de resistência para inibidor de protease, não polimórfica, pouco estudada. Confere baixo potencial nível de resistência a ATV/r, FPV/r, IDV/r e NFV, pontua 10 na escala de *Stanford*.

**Considerações sobre as mutações encontradas na RT (transcriptase reversa):**

**E138A:** E138A é uma mutação acessória polimórfica comum, fracamente selecionada em pacientes recebendo ETR e RPV. Reduz a susceptibilidade a ETR e a RPV em 2 vezes. Esta tem um peso de 1,5 na pontuação da escala de susceptibilidade genotípica de Tibotec para ETR GSS.

**V179D:** V179D é uma mutação acessória polimórfica selecionada em pacientes que receberam EFV. Reduz susceptibilidade a: (i) NVP e EFV em aproximadamente 2 a 5 vezes; (ii) ETR e RPV em 2 vezes. A combinação de V179D e K103R atuam em sinergia, reduzindo acima de 10 vezes a suscetibilidade a NVP e EFV. V179D tem um peso de 1,0 na pontuação da escala de susceptibilidade genotípica de Tibotec para ETR GSS.

**K103N\*:** K103N é uma mutação não polimórfica que provoca resistência de alto nível, com redução de aproximadamente 50 vezes para a NVP e aproximadamente 20 vezes ao EFV.

**P225H\*:** P225H é uma mutação não polimórfica selecionada pelo EFV que ocorre geralmente em combinação com a mutação K103N. A combinação de P225H e K103N provoca uma redução de aproximadamente 50 vezes na susceptibilidade ao EFV.

**L210W:** L210W é uma mutação que ocorre geralmente em combinação com M41L e T215Y. A combinação de M41, L210W e T215Y provoca alto nível de resistência ao AZT e ao d4T e intermediário a alto nível de resistência ao DDI, ABC e TDF.

**T69N:** T69N é uma mutação relativamente não-polimórfica, fracamente selecionada em pacientes que recebem ITRN. Seus efeitos sobre a susceptibilidade aos ITRN não foram bem estudados.

**T215S\*:** A presença da mutação T215S/C/D/E/I/V/N/A/L não reduz a susceptibilidade aos ITRN, mas surgem de vírus que já contiveram T215Y/F. A mutação T215Y/F causa resistência de nível intermediário a alto para AZT e d4T e resistência de baixo nível para ABC, DDI e TDF. A presença de uma destas mutações revertentes sugere a possibilidade de que o paciente pode ter abrigado uma população majoritária de vírus com T215Y/F.

\* *Mutações de resistência CPR*