

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Lindomar dos Anjos Silva

**APLICABILIDADE DE UMA METODOLOGIA *IN-HOUSE* DE DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM
SOROLOGIA POSITIVA PARA HIV NO ESTADO DO AMAPÁ**

Macapá

2015

Lindomar dos Anjos Silva

**APLICABILIDADE DE UMA METODOLOGIA *IN-HOUSE* DE DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS
COM SOROLOGIA POSITIVA PARA HIV NO ESTADO DO AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Gonzalo José Bello Bentancor
Ivano de Filippis

Macapá

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Silva, Lindomar dos Anjos

Aplicabilidade de uma metodologia *in-house* de diagnóstico e caracterização molecular em uma população de indivíduos com sorologia positiva para HIV no estado do Amapá. / Lindomar dos Anjos Silva – Macapá: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

75 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadores: Gonzalo José Bello Bentancor, Ivano de Filippis

1. HIV-1. 2. Epidemiologia Molecular. 3. Antirretrovirais. 4. Vigilância Epidemiológica. I. Título

Applicability of an *in-house* methodology for diagnosis and molecular characterization of HIV in a population of individuals from Amapá State.

Lindomar dos Anjos Silva

**APLICABILIDADE DE UMA METODOLOGIA *IN-HOUSE* DE DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM
SOROLOGIA POSITIVA PARA HIV NO ESTADO DO AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Flávia Barreto dos Santos (Doutora)
Instituto Oswaldo Cruz

Jaqueline Mendes de Oliveira (Doutora)
Instituto Oswaldo Cruz

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (Doutora)
Instituto Evandro Chagas

Gonzalo José Bello Betancor (Doutor) – Orientador
Instituto Oswaldo Cruz

Ivano de Filippis (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a Jesus Cristo,
Autor e Consumador da minha fé.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar, agradeço ao meu Deus por ter sido a minha força e socorro bem presente nos momentos de angústia e que fez eu não desistir mas permanecer firme para vencer todos os obstáculos.
- Aos meus filhos, Alexandre e Adriano dos Anjos, por suportarem a ausência da mãe e aos momentos estressantes.
- A Flávia Divino, um anjo que apareceu na minha vida como resposta de Deus. Sem sua ajuda e disponibilidade, não teria conseguido realizar todas as minhas análises em tempo hábil. Ganhei uma amiga para a vida toda.
- As amáveis Priscila, Silvia, Monick, Michelle, Suwellen e ao querido Edson do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, por todo cuidado, apoio, carinho e docilidade durante o tempo que permaneci nessa renomada instituição. Obrigada pela companhia nos almoços e por não deixarem eu me sentir uma “estranha no ninho”! Rs...
- A todas as integrantes da plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz pela receptividade, eficiência e rapidez na entrega das minhas sequências.
- Aos queridos amigos de trabalho que direta e indiretamente me deram suporte para que eu realizasse as minhas pesquisas bibliográficas, em especial, Aldo Proietti, Francis Pereira, Ivina Lopes, Cláudia Nóbrega, Uriel Davi, Márlisson Octávio e Clarice Rocha.
- Aos amados Camerom e Anne Caroline que foram incansáveis em ajudar catalogar todas as minhas amostras. Sem vocês, eu teria enlouquecido. Meu muito obrigada.
- Agradeço a toda equipe da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pelas disciplinas ofertadas, pelo potencial intelectual dos docentes, pelo excelente conteúdo programático, e por ter tido o privilégio de fazer parte do seletivo grupo de discentes.

- Ao Governo do Estado do Amapá (GEA), Secretaria de Estado da Saúde (SESA), Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN/AP), Coordenação Estadual de DST e AIDS/AP, Escola de Administração Pública (EAP/AP) e ao Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz.

- E para finalizar, o meu agradecimento muito especial aos meus estimados orientadores, Ivano de Fillipis e Gonzalo Bello pelo acolhimento enquanto orientadores, pela paciência, pelos “ralhos” que me fizeram crescer e amadurecer, e por todo conhecimento adquirido através das vossas experiências profissionais.

RESUMO

A epidemia de HIV-1 no Brasil constitui um fenômeno dinâmico e complexo composto por um mosaico de sub-epidemias regionais com um padrão heterogêneo de prevalência de distintas formas genéticas do vírus assim como de mutações de resistência transmitida aos antirretrovirais (TDRM). Há pouca informação disponível sobre o perfil epidemiológico molecular do HIV-1 no Norte do Brasil. Neste trabalho foi analisada a aplicabilidade de uma metodologia “*in-house*” para diagnóstico e caracterização molecular do DNA do HIV-1 associado à células de sangue periférico. Foram analisados 113 indivíduos virgens de tratamento, e com sorologia positiva para o HIV provenientes de diferentes municípios do Estado do Amapá. Foi possível amplificar e sequenciar os genes que codificam para a protease e para a transcriptase reversa viral em 97 (86%) dos 113 indivíduos analisados. A determinação do subtipo viral revelou que o clado mais prevalente do HIV-1 no Amapá foi o B (74%), seguido pelo subtipo F1 (14%), recombinantes BF1 (8%), subtipo C (1%), CRF31_BC (1%) e CRF02_AG (1 %). Apenas uma TDRM (K103N) foi detectada em um único paciente da nossa população de estudo. Concluiu-se que a metodologia *in-house* utilizada neste trabalho pode ser aplicada com sucesso na vigilância epidemiológica molecular da epidemia de HIV-1 no estado do Amapá. Este estudo revelou ainda que, a epidemia de HIV-1 no Amapá se caracteriza por um alto nível de diversidade genética, comparável ao observado nas principais cidades brasileiras, e uma baixa prevalência de TDRM (1%). Conseqüentemente, segundo as diretrizes da ONUSIDA não se faz necessário a implementação do teste de genotipagem de mutações de resistência antes da introdução da terapia antirretroviral na população de indivíduos infectados pelo HIV-1 no Amapá.

Palavras – chaves: HIV, epidemiologia molecular, resistência aos antirretrovirais, Amapá, Brasil.

ABSTRACT

The Brazilian HIV-1 epidemic is a dynamic and complex phenomenon composed of a mosaic of regional sub-epidemics with a heterogeneous pattern of prevalence of distinct genetic forms of the virus as well as of transmitted drug resistance mutations (TDRM) to antiretrovirals. There is little information available on the molecular epidemiology of HIV-1 in northern Brazil. This work examined the applicability of an “*in-house*” methodology for diagnosis and molecular characterization of HIV-1 DNA associated to peripheral blood cells. We analyzed 113 drug-naïve HIV-1-infected individuals from different municipalities in the state of Amapá. We amplified and determined the sequence of the genes that encode the viral protease and reverse transcriptase in 97 (86%) out of 113 subjects analyzed. The determination of viral subtype revealed that the most prevalent HIV-1 clade in Amapá was B (74%), followed by subtype F1 (14%), recombinant BF1 (8%), subtype C (1%), CRF31_BC (1%) and CRF02_AG (1%). Only one TDRM (K103N) was detected in one patient from our study population. In conclusion, the *in-house* methodology used in this work could be successfully applied for the molecular epidemiological surveillance of the HIV-1 epidemic in the state of Amapá. This study also revealed that the HIV-1 epidemic in Amapá is characterized by a high level of genetic diversity, comparable to that observed in major Brazilian cities, and a low prevalence of TDRM (1%). Thus, the implementation of resistance genotyping tests before the introduction of antiretroviral therapy is not necessary for the population of HIV-1-infected individuals in Amapá according to the UNAIDS guidelines.

Key – words: HIV, molecular epidemiology, resistance to antiretroviral agents, Amapá, Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Número estimado de adultos e crianças vivendo com HIV nas diferentes regiões geográficas | 16 |
| Figura 2 – Distribuição espacial das Pessoas Vivendo com HIV/aids (PVHA) vinculadas ao serviço público de saúde no Brasil | 18 |
| Figura 3 – Taxa de detecção de aids (por 100 mil habitantes) segundo região de residência por ano de diagnóstico no Brasil | 19 |
| Figura 4 – Número de casos de aids no Amapá segundo o ano de diagnóstico | 20 |
| Figura 5 – Taxa de detecção de aids (por 100 mil habitantes) segundo Unidade de Federação e capital de residência | 20 |
| Figura 6 – Número de casos de HIV com resultado reagente no teste rápido nos 16 municípios do Estado do Amapá no ano de 2013 | 21 |
| Figura 7 – Estrutura do HIV-1 | 22 |
| Figura 8 - Representação esquemática do genoma do HIV-1 | 23 |
| Figura 9 - Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV | 25 |
| Figura 10 – Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1..... | 26 |
| Figura 11 – Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 nas distintas regiões do Brasil | 27 |
| Figura 12 – Curso clínico, imunológico e virológico típico da infecção pelo HIV-1 ... | 28 |
| Figura 13 – Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de 2 anos | 30 |
| Figura 14 – Fluxograma do desenho experimental do presente projeto | 39 |
| Figura 15 – Distribuição dos indivíduos infectados pelo HIV-1 quanto ao sexo analisados na nossa casuística (LACEN-AP) e notificados na Coordenação DST/AIDS no Amapá durante o período 2007-2013 | 40 |
| Figura 16 – Distribuição por faixa etária dos indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados na nossa casuística (LACEN-AP) e notificados na Coordenação DST/AIDS | |

| | |
|--|----|
| no Amapá durante o período 2007-2013 | 41 |
| Figura 17 – Distribuição geográfica dos indivíduos HIV-positivos incluídos no estudo segundo o município de residência | 42 |
| Figura 18 – Distribuição por município de residência dos indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados na nossa casuística (LACEN-AP) e notificados na Coordenação DST/AIDS no Amapá durante o período 2007-2013 | 42 |
| Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos da amplificação por PCR do gene pol do HIV. | 43 |
| Figura 20 – Mediana, intervalos interquartis 25-75, mínimo e máximo de carga viral plasmática nos grupos de indivíduos com PCR positiva e negativa | 45 |
| Figura 21 – Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 estimados para a população de Amapá no presente trabalho (A) e no estudo de Machado et al (2009) (B) | 46 |
| Figura 22 – Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em indivíduos de sexo masculino e feminino | 47 |
| Figura 23 – Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em indivíduos com diferentes faixas etárias | 48 |
| Figura 24 – Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em indivíduos provenientes da região metropolitana (Macapá/Santana) e de outras cidades do interior do estado | 48 |
| Figura 25 – Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em homens e mulheres de diferentes faixas etárias provenientes da região metropolitana (Macapá/Santana) | 49 |
| Figura 26. Comparação da taxa de TDRM estimada em indivíduos provenientes de diferentes estados do Brasil | 50 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------|---|
| °C | Grau Celsius |
| µl | Microlitro(s) |
| ADRM | Mutações de resistência as drogas adquiridas (do inglês <i>acquired drug resistance mutations</i>) |
| Aids | Síndrome da Imunodeficiência adquirida |
| AZT | Zidovudina |
| CD4 | Grupo de diferenciação 4 (do inglês <i>cluster of differentiation 4</i>) |
| CDC | Centro de Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos da América |
| CRF | Forma recombinante circulante (do inglês <i>Circulating Recombinant Form</i>) |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DST | Doença Sexualmente Transmissível |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| <i>env</i> | Gene codificante das glicoproteínas do envelope viral |
| FDA | Food and Drug Administration |
| <i>gag</i> | Gene codificante das proteínas da estrutura interna da partícula viral |
| HAART | Terapia Antirretroviral Amplamente Ativa (do inglês <i>highly active antiretroviral therapy</i>) |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HSH | Homens que fazem sexo com homens |
| ICTV | Comitê Internacional de Taxonomia Viral (do inglês International Committee on Taxonomy of Virus) |
| IOC | Instituto Oswaldo Cruz |
| IP | Inibidores de protease |
| ITRN | Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos |
| ITRNN | Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa |
| MEGA | Molecular Evolutionary Genetics Analysis |
| pb | Pares de base |
| <i>pol</i> | Gene codificante das proteínas enzimáticas do HIV |

| | |
|---------|--|
| PR | Protease |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SISGENO | Sistema online de genotipagem |
| SIV | Vírus da Imunodeficiência Símia |
| TARV | Terapia antirretroviral |
| TDRM | Mutações de resistência as drogas transmitidas (do inglês <i>transmitted drug resistance mutations</i>) |
| TR | Transcriptase reversa |
| UNAIDS | Programa das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (do inglês United Nations Programme on HIV/AIDS) |
| URF | Forma recombinante única (do inglês, <i>Unique Recombinant Form</i>) |
| WB | Western-Blot |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 | CONTEXTO HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA | 15 |
| 1.2 | EPIDEMIA DE HIV/AIDS NO BRASIL | 16 |
| 1.3 | EPIDEMIA DE HIV/AIDS NO AMAPÁ | 19 |
| 1.4 | MORFOLOGIA DO HIV | 22 |
| 1.5 | CICLO REPLICATIVO DO HIV | 23 |
| 1.6 | EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV | 25 |
| 1.7 | EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV NO BRASIL E NO AMAPÁ ... | 27 |
| 1.8 | HISTÓRIA NATURAL E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV | 28 |
| 1.9 | TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ATIVA (HAART) | 31 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 35 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 | POPULAÇÃO DE ESTUDO | 36 |
| 4.2 | COLETA DAS AMOSTRAS | 36 |
| 4.3 | EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL | 36 |
| 4.4 | SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES <i>pr</i> E <i>rt</i> DO GENE <i>POL</i> DO HIV .. | 37 |
| 4.5 | CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO HIV | 38 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 | CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS INDIVÍDUOS | 40 |
| 5.2 | AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>pol</i> DO HIV | 43 |
| 5.3 | DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 NO AMAPÁ | 45 |
| 5.4 | RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS INDIVÍDUOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1..... | 47 |
| 5.5 | ANÁLISES DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA | 49 |
| 6 | CONCLUSÕES | 51 |
| | REFERÊNCIAS | 52 |
| | ANEXO A – POP GENOTIPAGEM PROTOCOLO <i>IN HOUSE</i> | 58 |
| | ANEXO B – PORTARIA Nº 29, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2013 | 70 |
| | ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO | 72 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

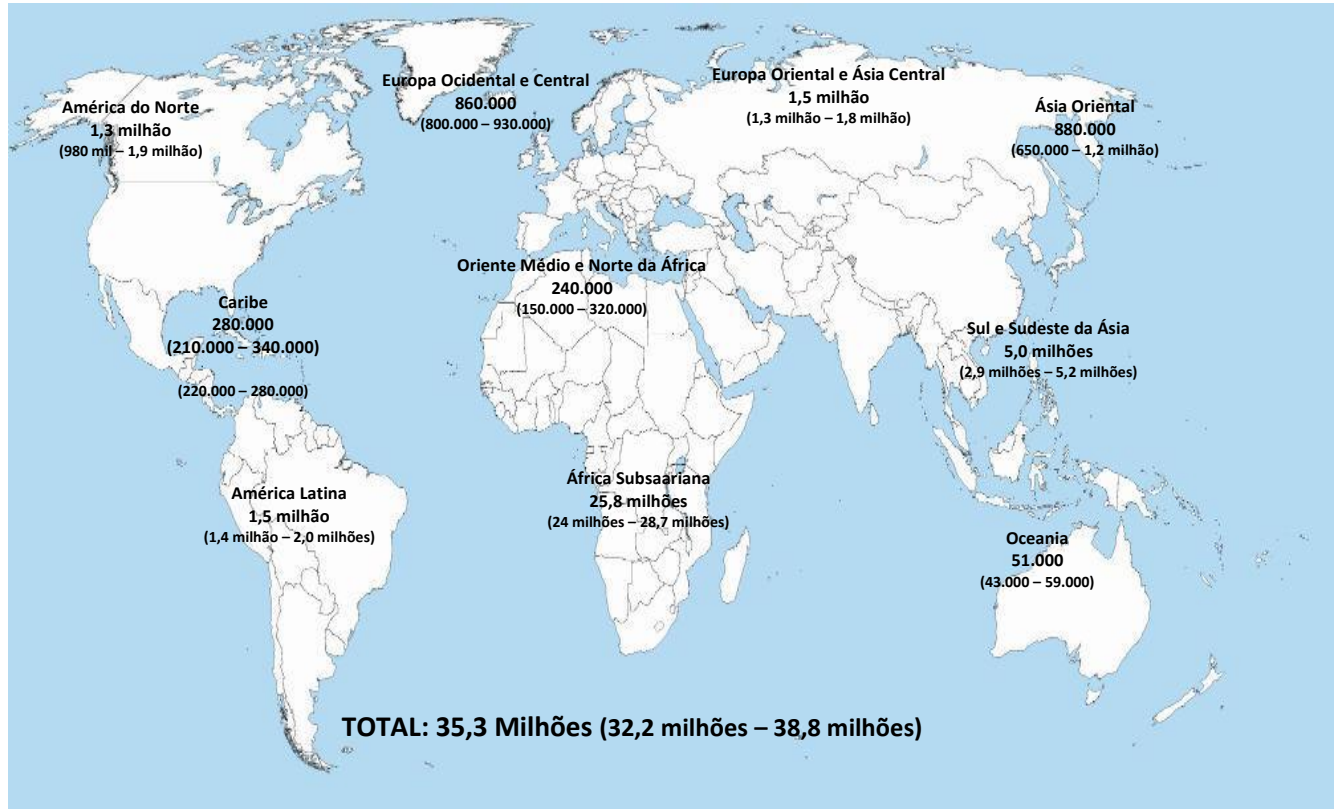
O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids). A Aids teve seu reconhecimento oficial no início da década de 1980, quando o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América notificou os primeiros casos de imunodeficiência associada a pneumonia e sarcoma de Kaposi em jovens homossexuais masculinos dos estados de Nova York e Califórnia que eram previamente saudáveis (CDC, 1981; CDC, 1982). Esse episódio levou à comunidade científica a conclusão que se tratava de uma doença, ainda desconhecida e de possível etiologia infecciosa e transmissível que ocasionava um grande número de mortes. Até 1983, as principais rotas de transmissão da nova síndrome (sexual, parenteral e vertical) já haviam sido traçadas.

Em 1983, surgiram as primeiras indicações de que o agente causador da Aids era um retrovírus, quando o grupo de pesquisa do Dr. Luc Montagnier detectou, na França, a atividade da enzima transcriptase reversa em uma cultura de células T obtidas da biópsia de linfonodo de um jovem homossexual com linfadenopatia (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983). A evidência final de que o retrovírus isolado era o agente causador da Aids e não uma infecção oportunista foi demonstrada no ano seguinte nos EUA, pelo grupo de pesquisa do Dr. Robert Gallo (POPOVIC *et al.*, 1984; SARNGADHARAN *et al.*, 1984).

Em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) recomendou o termo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), reconhecendo-o como um novo retrovírus capaz de infectar seres humanos.

A epidemia de HIV/aids continua a ser um dos grandes desafios para a saúde global e representa um fenômeno dinâmico, com apresentação de diferentes tendências variando de acordo com o grupo populacional, país ou região afetados (Figura 1). Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids (UNAIDS), 36,9 milhões de pessoas viviam com HIV/aids e 1,2 milhões morreram de causas associadas à aids no mundo inteiro até o final de 2014 (UNAIDS, 2015).

Figura 1. Número estimado de adultos e crianças vivendo com HIV nas diferentes regiões geográficas do mundo. Fonte: Adaptado de UNAIDS, 2015.



1.2. EPIDEMIA DE HIV/AIDS NO BRASIL

Os primeiros casos notificados no Brasil começaram a partir de 1980 e em 1983 o primeiro caso de Aids no sexo feminino. A partir de 1984, o Brasil começou a estruturação dos programas de saúde ao controle da Aids, tendo como ponto de partida o estado de São Paulo. Em 1986, houve a criação do Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde. Desde então, como descritos a seguir, começam a acontecer fatos históricos e importantes (MACEDO, 2010).

1985 – Liberação do primeiro teste anti-HIV para o diagnóstico da Aids. Nesse período começa a se utilizar o termo “comportamento de risco” ao invés de “grupos de risco”.

1986 – Criação do Programa Nacional de DST e Aids (PN DST/Aids).

1987 – Utilização do medicamento AZT (Zidovudina) em pacientes com Aids, diminuindo a multiplicação do vírus HIV. Antes dessa data, esse medicamento era empregado em pacientes com câncer. A Organização das Nações Unidas designa

o dia 1º de dezembro como o Dia Nacional de Combate a Aids.

1988 – Formação do Sistema Único de Saúde (SUS).

1991 – Aquisição e distribuição dos antirretrovirais são introduzidas gratuitamente pelo Ministério da Saúde do Brasil.

1993 – Produção do AZT no Brasil e uma ampla propalação da transmissão heterossexual do HIV.

1994 – Demonstração por meio de estudo, que o medicamento AZT (Zidovudina) promoveu uma redução na transmissão vertical (mãe para filho) durante a gravidez e parto. Definição do diagnóstico em crianças.

1995 – Novas drogas antirretrovirais são encontradas, dentre as quais os inibidores de protease (PI).

1996 – Redução das taxas de mortalidade e um número crescente de casos em mulheres.

1997 – Ocorre implantação da Rede Nacional de Laboratórios.

1998 – O TARV, popularmente chamado de “coquetel” no Brasil, fez com que alguns dos pacientes obtivessem um resultado de carga viral indetectável no sangue, durante a fase de tratamento.

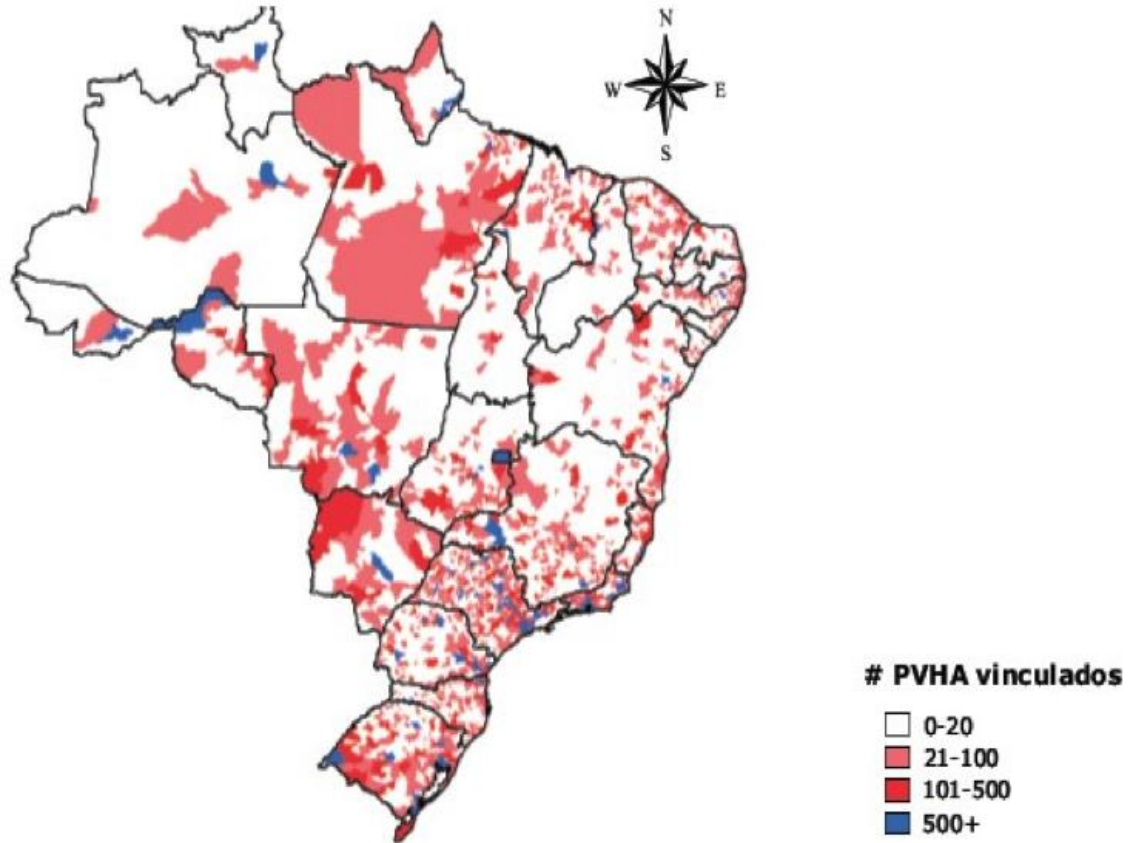
1999 – Decresce em 50% o número de mortes ocorridas em pacientes com Aids.

2000 – O Continente Africano é o mais atingido mundialmente: 17 milhões morrem com Aids, onde 3,7 milhões eram crianças e 8,8% dos adultos apresentavam-se contaminados pelo vírus.

O total de casos de HIV/aids acumulados e registrados no Brasil desde 1980 até junho de 2014 é de 757.042 casos, 65% em homens e 35% em mulheres (Ministério da Saúde, 2014a). A taxa de incidência brasileira encontra-se estabilizada nos últimos cinco anos em 20/100.000 habitantes.

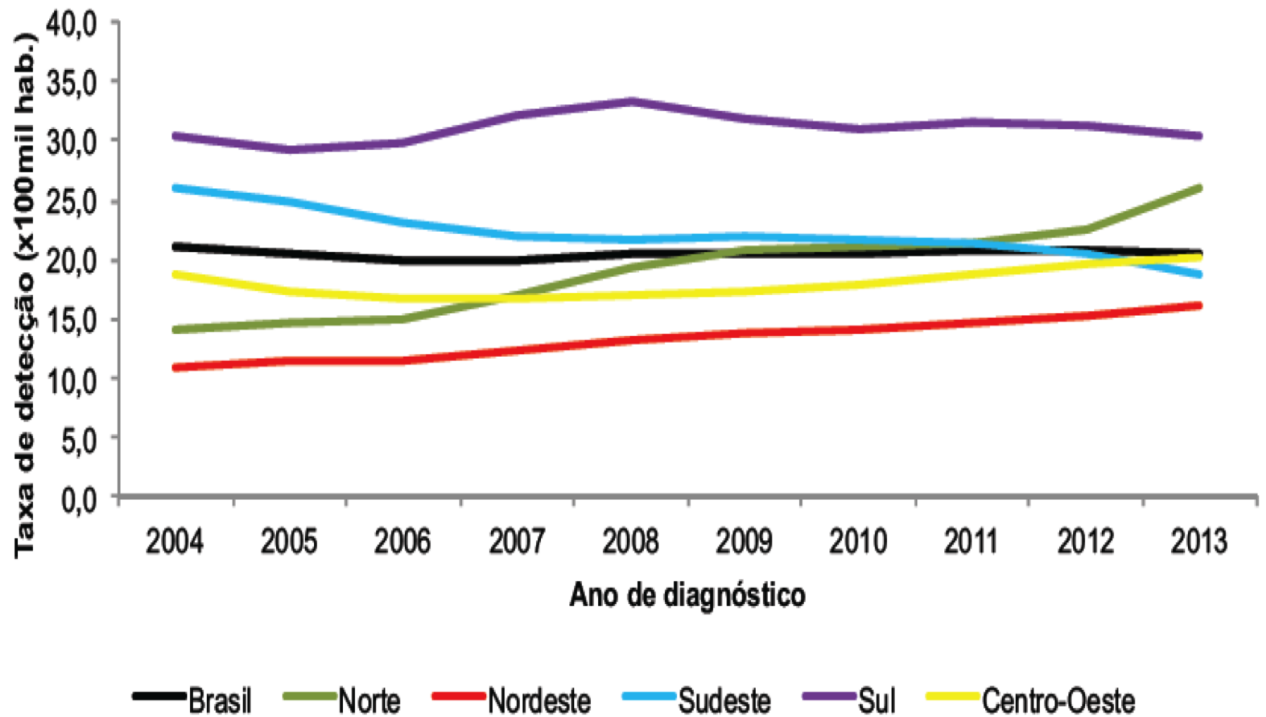
A epidemia de HIV/Aids no Brasil apresenta tendências de “juvenização” e “feminização”. Dessa forma, observa-se um aumento crescente no número de infecções em mulheres jovens de 15 a 24 anos (Ministério da Saúde, 2011a). A epidemia de HIV/aids no Brasil apresenta também uma tendência de “interiorização”, tendo ocorrido uma disseminação do vírus desde as grandes metrópoles das regiões Sudeste e Sul para as outras regiões distantes do epicentro da epidemia (Ministério da Saúde, 2013) (Figura 2).

Figura 2. Distribuição espacial das pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) vinculadas ao serviço público de saúde no Brasil. Fonte: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais / Casos registrados no Siscel e no Siclom até 31/12/2012.



Registrou-se na última década uma diminuição na taxa de incidência na região Sudeste (de 24,5 para 17,6 casos por 100 mil habitantes), uma estabilização na região Sul (de 27,1 para 28,8 casos por 100 mil habitantes) e um aumento nas regiões Centro-Oeste (13,9 para 15,7 casos por 100 mil habitantes), Nordeste (de 7,1 para 12,6 casos por 100 mil habitantes) e Norte (de 7,0 para 20,6 casos por 100 mil habitantes) (Ministério da Saúde, 2014) (Figura 3).

Figura 3. Taxa de detecção de aids (por 100 mil habitantes) segundo região de residência por ano de diagnóstico no Brasil. Fonte: Casos notificados no Sinan e Siscel/Siclom até 30/06/2014 e no SIM de 2000 até 2013. MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.



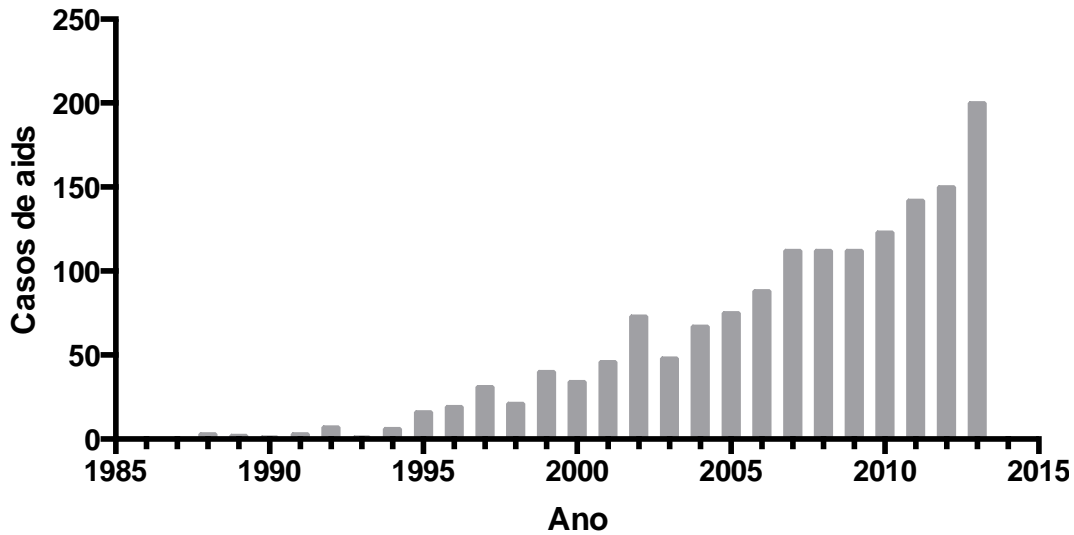
Esse acentuado aumento da incidência nas regiões Norte e Nordeste pode refletir o aumento da transmissão viral, assim como uma ampliação do acesso ao diagnóstico pela população através da implantação dos testes de triagem, como por exemplo o “teste rápido”, nas áreas de difícil acesso.

1.3. EPIDEMIA DE HIV/AIDS NO AMAPÁ

O Estado do Amapá faz parte da vasta região Amazônica e está localizado no extremo norte do Brasil, fazendo fronteira com a Guiana Francesa. Segundo o último Censo realizado em 2010, o estado possui uma área de 142.814,585 km² e uma população estimada em 669.526 habitantes, dos quais 499.466 residem nos municípios de Macapá e Santana.

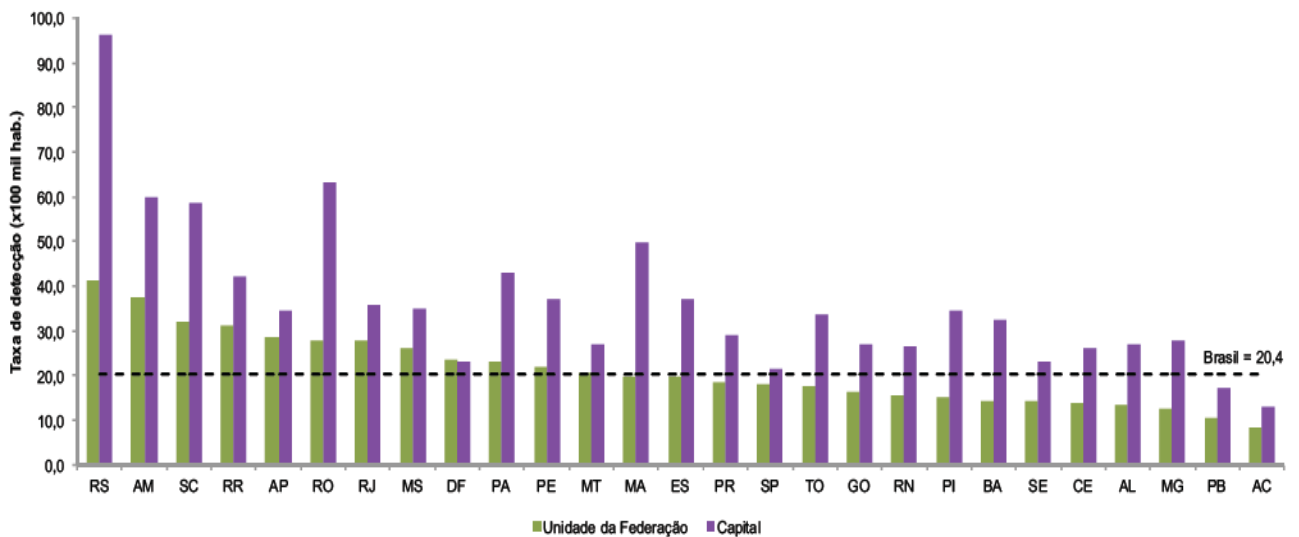
Desde 1988, ano do primeiro caso de Aids notificado no Amapá, até junho de 2014, o estado notificou um total de 1.596 casos de aids (Ministério da Saúde, 2014a) (Figura 4).

Figura 4. Número de casos de Aids no Amapá segundo o ano de diagnóstico. Fonte: Casos notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel/Siclom até 31/12/2013. MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.



Em 2013, a taxa de incidência de aids no estado foi de 28,6/100.000 habitantes, comparável com a taxa média da região Norte (26,1/100.000 habitantes) e acima da taxa média registrada no Brasil (20,4/100.000 habitantes) (Ministério da Saúde, 2014a) (Figura 5).

Figura 5. Taxa de detecção de aids (por 100 mil habitantes) segundo Unidade de Federação e capital de residência. Fonte: Casos notificados no Sinan e Siscel/Siclom até 30/06/2014 e no SIM de 2000 até 2013. MS/SVS/Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.



Durante este período, observa-se que a epidemia no Estado vem tomando uma tendência à juvenização, feminização e interiorização, já que a maioria dos casos de Aids descritos no Estado até 1996 estavam restritos ao município de Macapá, casos de aids já são notificados nos dezesseis municípios do Estado (Ministério da Saúde, 2011b). Até 2002, o diagnóstico do HIV era restrito na capital, Macapá. Com a implantação da testagem rápida para o HIV e Sífilis para gestantes dentro do Projeto Nascer-Maternidades, houve um grande avanço no conhecimento da tendência da expansão da epidemia em todo o Estado (Figura 6).

Figura 6. Número de casos de HIV com resultado reagente no teste rápido (Imunocromatográfico) nos 16 municípios do Estado do Amapá no ano de 2013. Fonte: Coordenação de DST/Aids do Estado do Amapá.

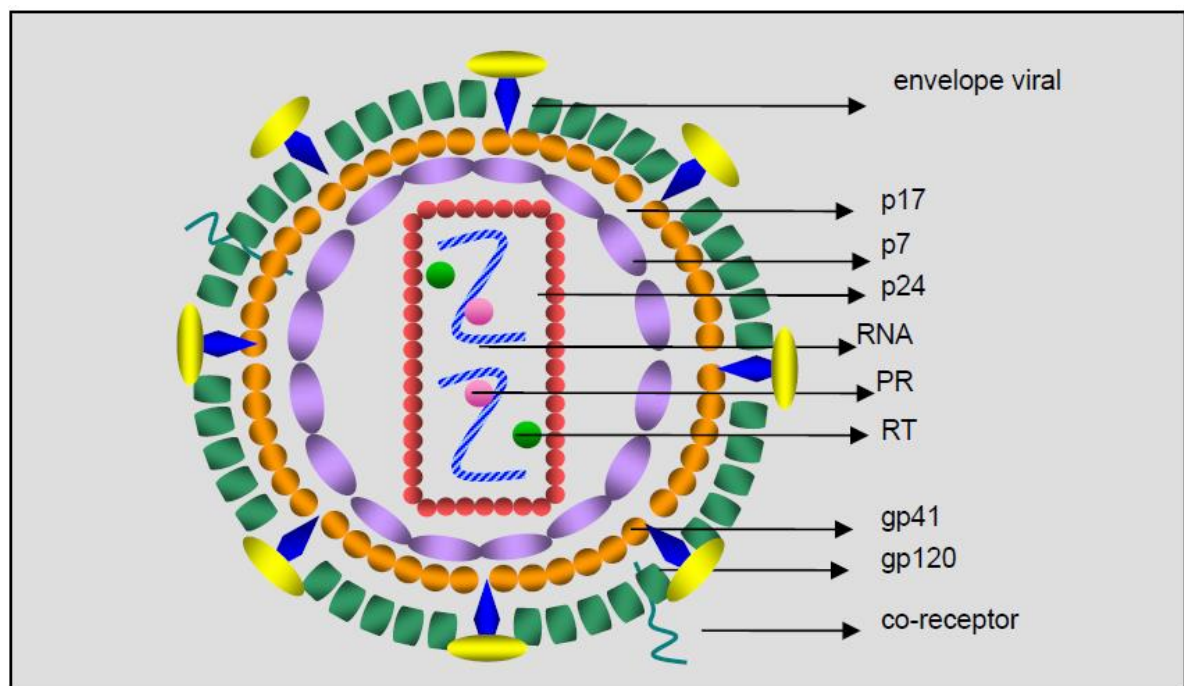


Segundo a Coordenação Estadual de DST/Aids, até abril de 2014 foram cadastrados no Serviço de Assistência Especializada do Amapá (SAE-AP) 1.592 pessoas, entre pacientes assintomáticos e pacientes com quadro de Aids (Ministério da Saúde, 2014b). Deste total, 335 (21%) pessoas receberam terapia antirretroviral. Não há informação se para os demais indivíduos (79%) não há indicação da terapia antirretroviral ou se não conseguiram acessar o serviço.

1.4. MORFOLOGIA DO HIV

Apresentando uma forma esférica, o HIV-1 possui um envelope externo lipoproteico com origem à partir da membrana externa da célula hospedeira, com 100 nanômetros (nm) de diâmetro em média, simetria icosaédrica; o genoma viral apresenta na sua constituição ácido ribonucleico (RNA) com duas fitas simples vinculado a uma RNA polimerase, a transcriptase reversa. (VERONESE *et al.*, 1985; LUCIW, 1996) (Figura 7).

Figura 7. Estrutura do HIV-1.

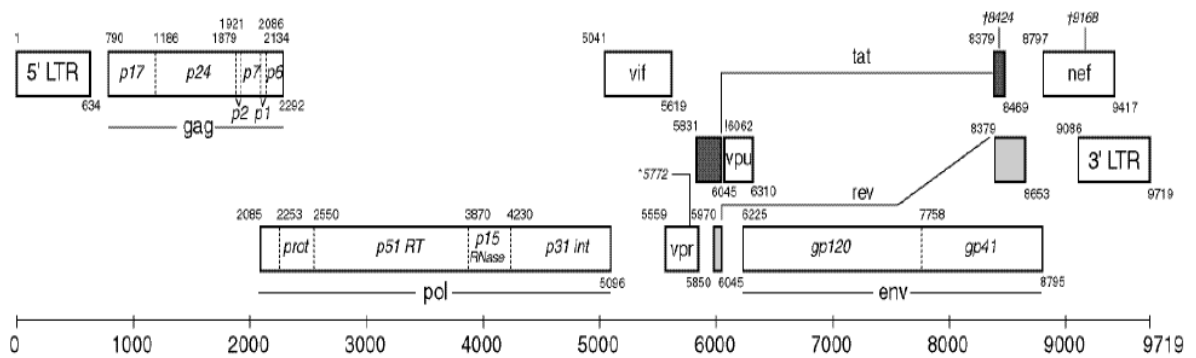


Fonte: MACÊDO, 2010.

Resultado de transmissões zoonóticas diferentes do vírus da imunodeficiência de símios (SIV) para humanos, o HIV-1 e o HIV-2 distinguem-se por suas sequências nucleotídicas, origem e relações filogenéticas com outros SIV (HAHN *et al.*,2000).

Possuindo 9,8 Kilobases (Kb), o genoma do HIV-1 apresenta nove genes e duas regiões nas suas extremidades 5´ e 3´ nomeadas sequências de repetição terminal (LTR), nas quais estão presentes os elementos de controle para integração, transcrição e poliadenilação do RNA mensageiro (mRNA). Divididos em dois grupos, existem os genes que codificam as proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e os que codificam as proteínas não estruturais (*tat*, *ver*, *nev*, *vif*, *vpu* e *vpr*) (MUESING *et al.*, 1985) (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática do genoma do HIV-1.



Fonte: Los Alamos HIV (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>), 2014.

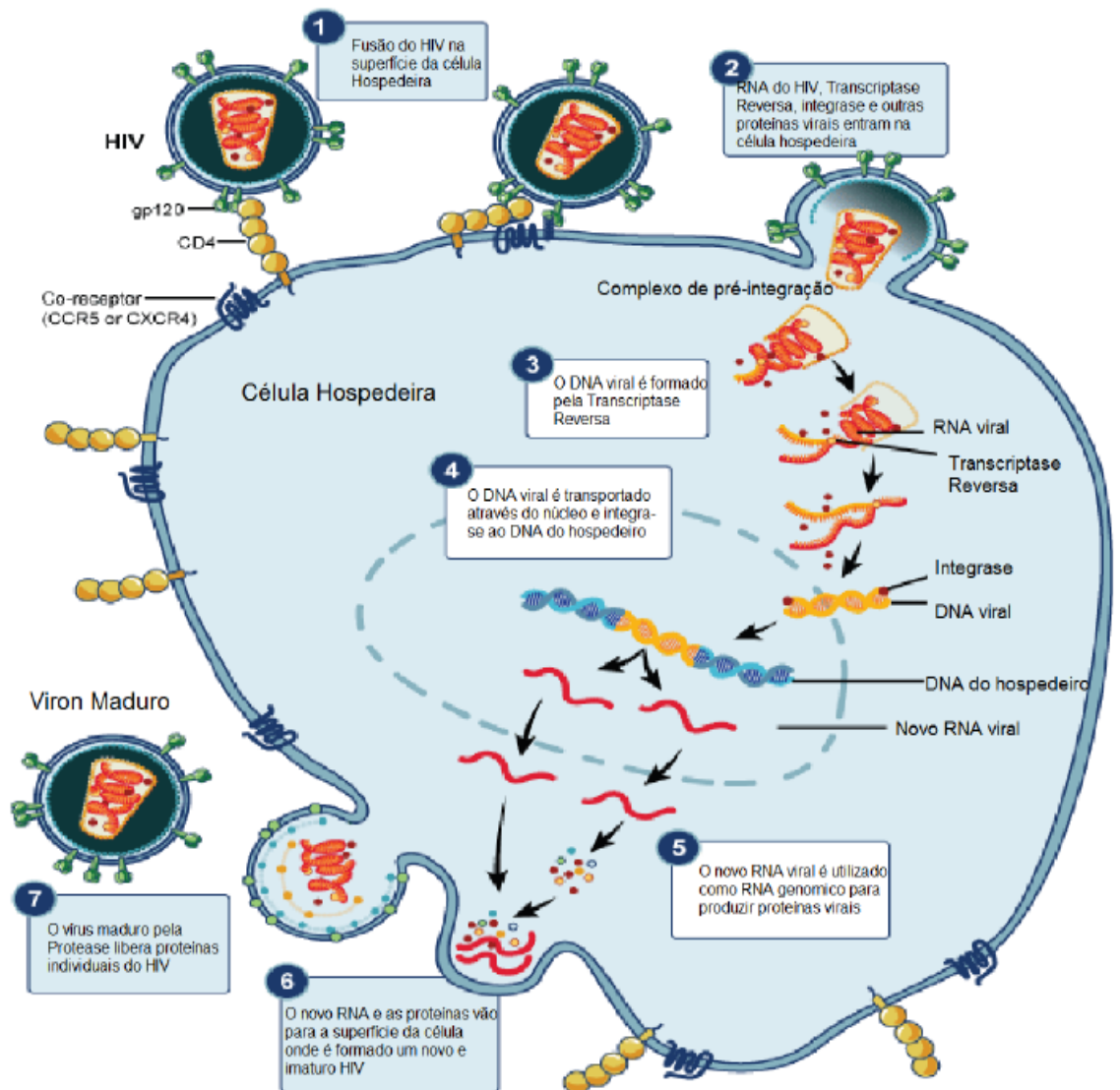
1.5. CICLO REPLICATIVO DO HIV

O ciclo replicativo do HIV inicia-se com a união da proteína gp120 do envelope viral com a molécula de superfície CD4 (proteína tipo imunoglobulina expressa na superfície de células T e macrófagos primários) (MELO, BRUNI e FERREIRA, 2006) (Figura 9). Posterior a essa fusão inicial, a alça V3 (principal região imunodominante do HIV, levando a formação de anticorpos neutralizantes e atuando como alvo da resposta celular citotóxica) da proteína gp120 fica exposta e habilitada para a ligação com co-receptores (receptores de citosinas). Após esta junção, a proteína gp41 regula o processo de fusão

das membranas celular e viral por meio de uma região peptídica N-terminal hidrofóbica com grande quantidade de glicina (GROTO e PARDINI, 2006; PEÇANHA, 2002). Ao adentrar no citoplasma celular, ocorre o processo de transcrição reversa através da enzima viral transcriptase, que resulta na síntese de uma molécula de DNA de fita dupla. Após o DNA viral ser sintetizado, ele é transportado até o núcleo da célula onde passa a ser integrado ao cromossomo celular por meio da enzima viral integrase (GROTO e PARDINI, 2006).

Desse momento em diante, o vírus pode manter-se em latência, não havendo transcrição do DNA viral em RNAm viral, ou o DNA celular pode ser transcrito, ocorrendo a produção de RNAm viral (GROTO e PARDINI, 2006). Os RNAm virais vão ser traduzidos no citoplasma, gerando novas proteínas virais. Posteriormente, ocorre a montagem do vírus nas proximidades da membrana celular gerando partículas imaturas que durante e/ou após o processo de brotamento através da membrana celular, sofrem um processo de maturação (clivagem das poliproteínas *gag* e *gag-pol* pela protease viral). Este processo de maturação é fundamental para que os viriões liberados sejam capazes de infectar novas células de forma produtiva (PEÇANHA, 2002).

Figura 9: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV.



Fonte: BELOTO, 2014.

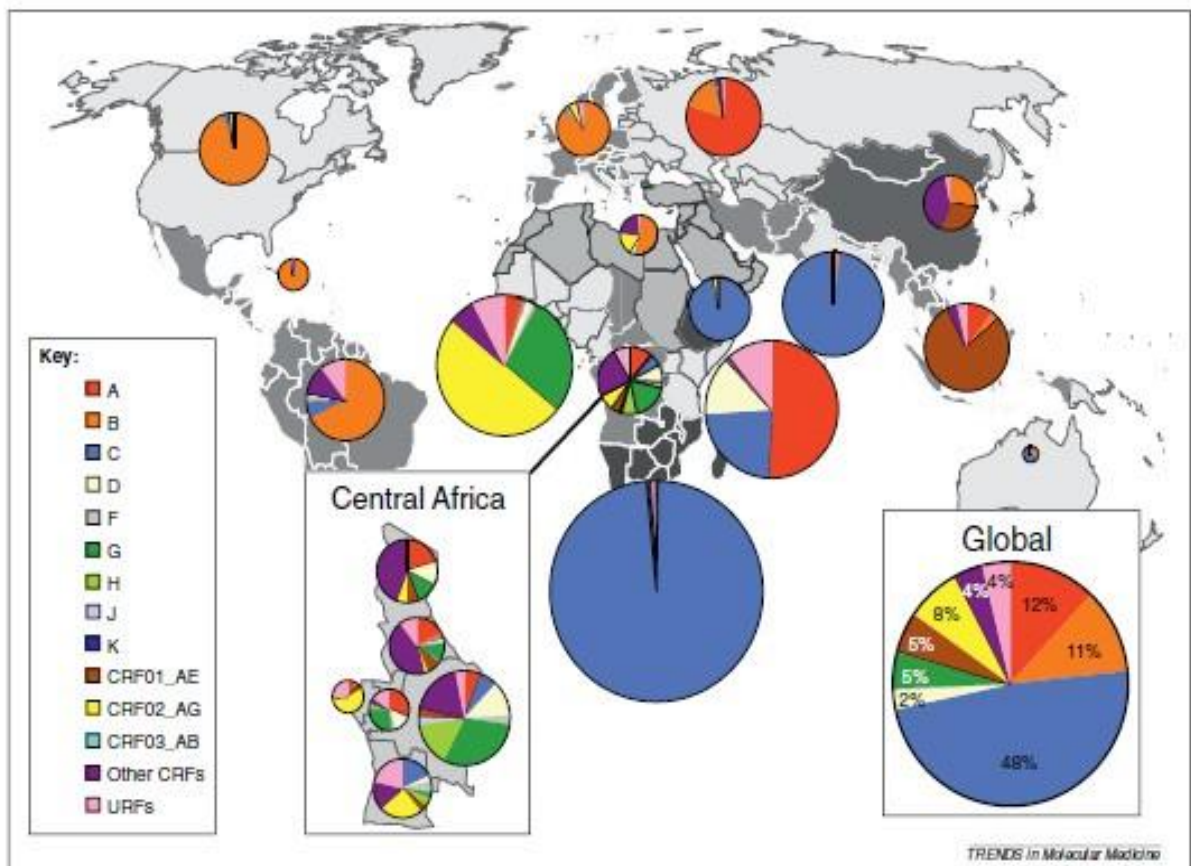
1.6. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* e se divide em dois tipos: o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 e tipo 2 (HIV-1 e HIV-2). Enquanto o HIV-1 é o responsável pela pandemia de aids, o HIV-2 está restrito principalmente ao Oeste Africano. Estudos filogenéticos e evolutivos indicam que o HIV-1 e o HIV-2 emergiram a partir de transmissões zoonóticas independentes do Vírus da Imunodeficiência de Símios (SIV) de primatas não humanos para humanos, provavelmente na região da África Central (HIV-1) e Ocidental (HIV-2) (SHARP, ROBERTSON e HAHN, 1995).

O HIV-1 é classificado filogeneticamente em quatro grupos designados com as letras M, N, O e P. O grupo M é o responsável pela pandemia de aids e estima-se que tenha sido introduzido na população humana entre 1900 e 1930 (KORBER et al., 2000). As cepas de HIV-1 correspondentes ao grupo M se agrupam filogeneticamente em nove clados distintos denominados subtipos virais designados com letras (A, B, C, D, F, G, H, J e K), sub-subtipos designados com números (A1-A5, F1-F2), e diversas formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) entre os subtipos (ROBERTSON et al., 2000).

O subtipo mais prevalente a nível global é o subtipo C (responsável por quase metade das infecções em todo o mundo), seguido pelo subtipo A (prevalente nos países do leste Africano), subtipo B (de maior prevalência na América, Europa e Oceania), o CRF02_AG (prevalente na África Ocidental) e o CRF01_AE (prevalente no Sudeste Asiático) (HEMELAAR et al., 2011) (Figura 10).

Figura 10. Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1.

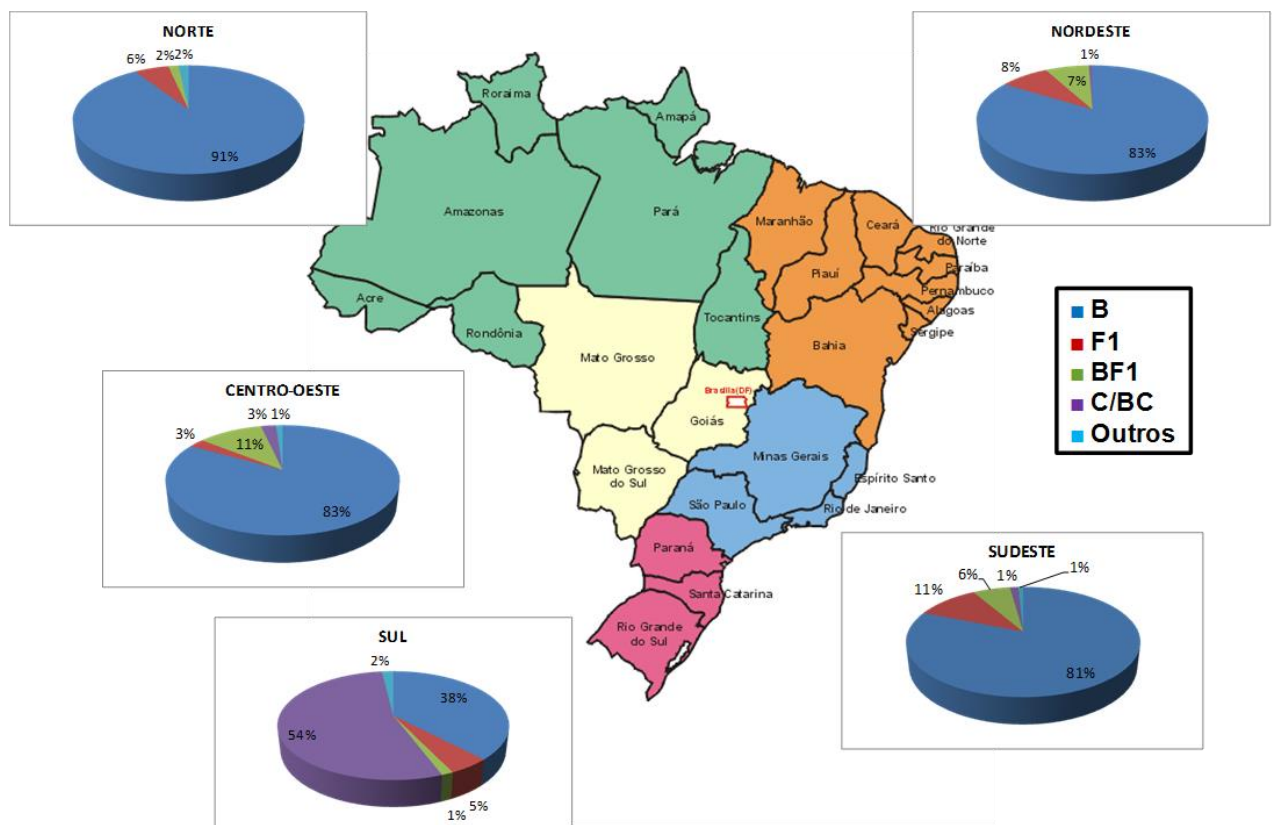


Fonte: (HEMELAAR et al., 2011).

1.7. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV NO BRASIL E NO AMAPÁ

As variantes genéticas do HIV-1 mais prevalentes no Brasil são os subtipos B, C, F1 e formas recombinantes entre eles (BF1 e BC) (BELLO *et al.*, 2011). Na maioria das regiões do Brasil, a variante de HIV-1 mais prevalente é o subtipo B (responsável por 75 a 90% das infecções), seguido pelo subtipo F1 e formas recombinantes BF1 (responsáveis 10 a 25% das infecções). Na região Sul, no entanto, predomina o subtipo C e formas recombinantes BC que em conjunto são responsáveis por mais de 50% das infecções, seguidos pelo subtipo B (Figura 11).

Figura 11. Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1, nas distintas regiões do Brasil.



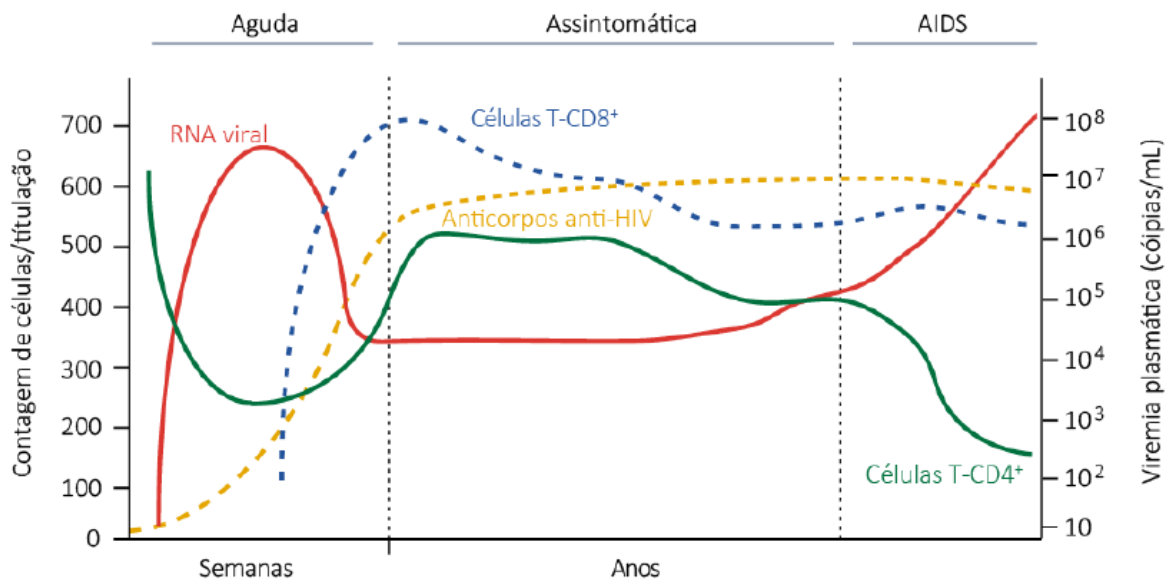
Existem poucos estudos sobre a diversidade genética do HIV-1 no extremo Norte do Brasil, e particularmente no Estado do Amapá. O único estudo publicado até o momento no Amapá descreve a diversidade genética nos genes *env* e *pol* em um número restrito de indivíduos da cidade de Macapá (MACHADO *et al.*, 2009).

Segundo este trabalho, foi observado um predomínio do subtipo B (88%) no Estado, indicando desta forma que o Amapá segue o mesmo perfil epidemiológico encontrado em quase todas as regiões do Brasil.

1.8. HISTÓRIA NATURAL E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV

Os indivíduos infectados pelo HIV evoluem para uma grave disfunção do sistema imunológico à medida que vão sendo destruídos os linfócitos TCD4⁺, umas das principais células alvo do vírus. O espectro clínico da infecção pelo HIV, no entanto, é amplo e complexo, podendo ser dividido em três etapas: fase aguda, fase assintomática, e fase aids (SIMON, HO E KARIM, 2006) (Figura 12).

Figura 12. Curso clínico, imunológico e virológico típico da infecção pelo HIV-1.



Fonte: Adaptado de Simon, Ho e Karim (2006).

A fase inicial ou fase aguda da infecção pelo HIV ocorre após a infecção pelo vírus, e assemelha-se clinicamente à mononucleose infecciosa, com febre, faringite, mialgia, perda de peso, fadiga linfadenopatia generalizada e cefaleia, e pode se estender por algumas semanas. Nessa fase, ocorre uma replicação intensa do vírus que leva a um aumento exponencial da viremia plasmática, atingindo um pico de carga viral após 21-28 dias a partir da infecção inicial. Esta fase, conhecida como janela imunológica, caracteriza-se por níveis de

anticorpos indetectáveis no soro contra as proteínas do HIV (MANAVI, 2006; LEVY, 2009).

Após a viremia observada na fase aguda, segue-se uma redução da carga viral por volta de 12 a 20 semanas após o início da infecção em decorrência da ativação da resposta imune celular específica contra o vírus. Isto leva a uma estabilização da carga viral (ou “set point” viral) que marca o início da fase crônica da infecção, caracterizada por uma latência clínica (ausência de sintomas). No início da fase assintomática, de seis semanas a seis meses após a infecção, ocorre a soroconversão que se caracteriza pela detecção no soro de anticorpos contra as principais proteínas do HIV que são codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env*.

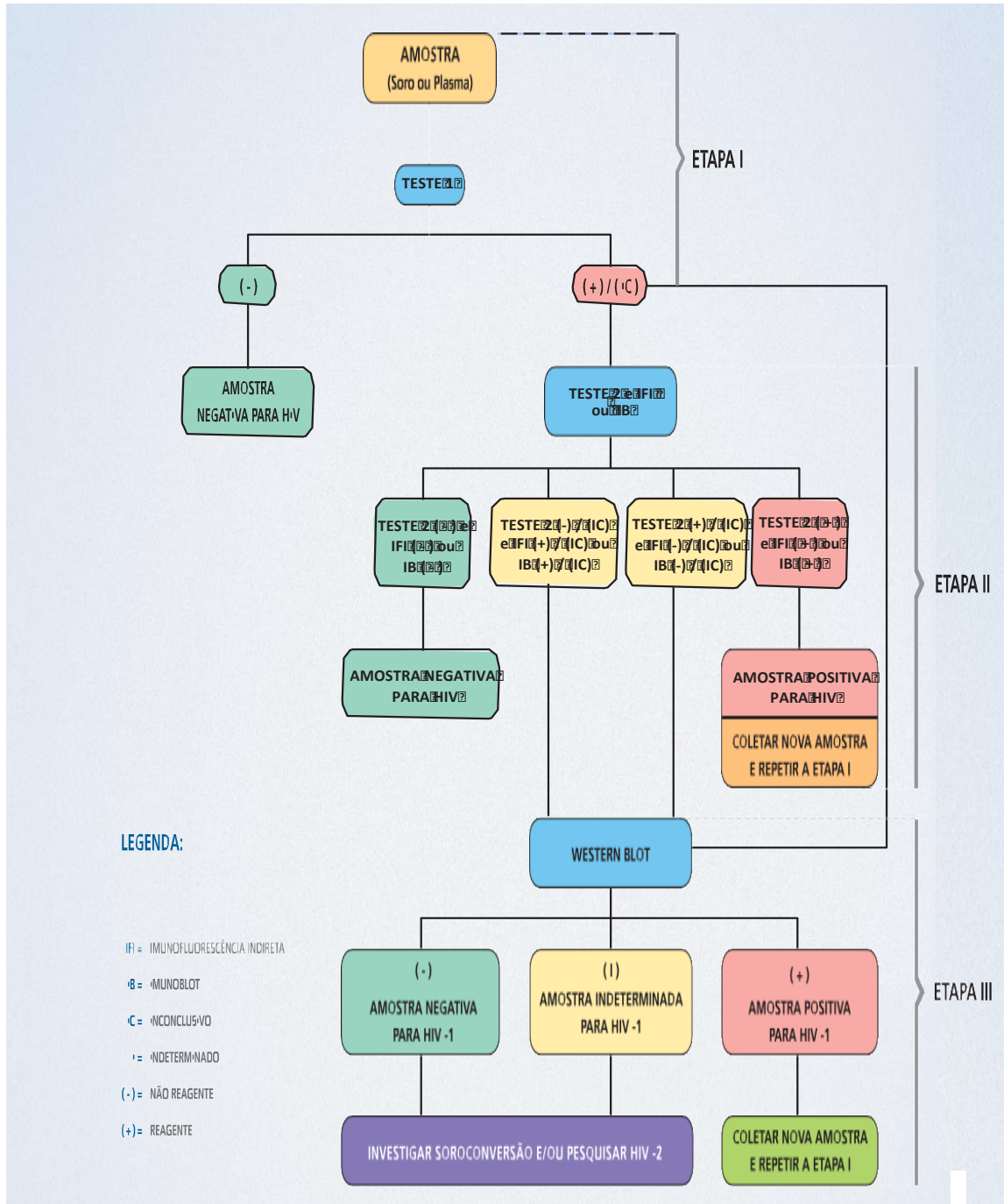
Durante a fase assintomática que pode prolongar-se em média entre sete a 10 anos, os indivíduos infectados não apresentam sintomas, mas há replicação contínua do vírus predominantemente nos tecidos linfóides e uma queda na contagem de células T CD4⁺. Nos estágios finais da infecção, ocorre um aumento da carga viral plasmática e o aparecimento da aids no indivíduo, com febre prolongada (> 1 mês), fadiga, perda ponderal, diarreia e infecções oportunistas como pneumonia por *Pneumocystis carinii*, criptosporidíase, ou encefalite por *Toxoplasma gondii*. As infecções oportunistas ocorrem geralmente quando há imunossupressão profunda e são raras antes da contagem de linfócitos TCD4⁺ cair para menos de 200 células/mm³ de sangue (FANALES-BELASIO et al, 2010).

Como a infecção pelo HIV pode ou não ter expressão clínica durante a fase aguda e apresenta um longo período assintomático, é de grande relevância o entendimento da dinâmica da variação da carga viral e de outros marcadores imunológicos (anticorpos anti-HIV e número de linfócitos T CD4⁺) ao longo do tempo visando o diagnóstico da infecção pelo HIV. Os testes para detecção da infecção pelo HIV são divididos basicamente em três grupos: 1) detecção de anticorpos frente ao vírus, 2) detecção de antígenos virais, e 3) detecção do genoma do vírus.

O diagnóstico laboratorial do HIV no Brasil passou a ser normatizado pelo Ministério da Saúde por meio da Portaria 151/2009, de 14 de outubro de 2009 que determina um conjunto de procedimentos em sequência para detecção de anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de 2 anos (Ministério da Saúde, 2013b) (Figura 13). Essa Portaria preconiza a realização de triagem com duas ou três etapas de confirmação sorológica e determina ainda o uso do teste rápido para o diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais. Posterior a Portaria

151/2009, surge a Portaria Nº 29 de 17 de dezembro de 2013 que revoga a portaria acima citada e aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças (ANEXO B).

Figura 13. Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de 2 anos.



Fonte: Ministério da Saúde (http://www.aids.gov.br/sites/default/files/fluxograma_deteccao_anticonpos_antihiv_2anos.pdf).

As técnicas rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo HIV são baseadas na detecção de anticorpos anti-HIV contra o vírus através de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA), apresentando percentuais superiores a 99% em relação a sensibilidade e especificidade. Estas técnicas apresentam excelentes resultados, são menos dispendiosas e de escolha para toda e qualquer triagem inicial. Testes reagentes de ELISA deverão ser repetidos e confirmados. No caso de amostras positivas, as mesmas devem ser confirmadas pela metodologia de Western Blot (WB), que é capaz de identificar anticorpos p24, gp41 e gp120/gp160 do HIV (GUPTA, V.; GUPTA, S., 2004; MANAVI, 2006; BRASIL, 2009). Durante a janela imunológica, período que compreende entre a infecção pelo vírus e a evolução da resposta humoral culminando com a produção de anticorpos, poderão ocorrer resultados falso-negativos para os testes de detecção de anticorpos. Considera-se para a janela imunológica um tempo de três meses, ressaltando, porém, que já existem testes que conseguem fazer a detecção de anticorpos anti-HIV em até três semanas após contrair a infecção (GUPTA, V.; GUPTA, S., 2004; MANAVI, 2006).

As outras duas técnicas de diagnóstico baseadas na detecção direta das proteínas ou do genoma (DNA ou RNA) viral são aplicadas quando os exames sorológicos são indeterminados ou quando a detecção de anticorpos não é possível como no diagnóstico de infecção aguda (quando ainda não foi desenvolvida uma resposta imune adaptativa específica frente ao vírus) e no diagnóstico da transmissão vertical (quando há a transmissão passiva dos anticorpos maternos pela placenta) (Ministério da Saúde, 2013b). Desta forma, os testes moleculares para a detecção de ácidos nucleicos são principalmente utilizados na triagem de doadores de sangue com o objetivo de aumentar a segurança do sangue e de hemoderivados, e no diagnóstico da infecção em crianças entre 2 e 24 meses de vida (Portaria nº488/98/SVS/MS de janeiro de 2000).

1.9.TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ATIVA (HAART)

A HAART, composta por uma combinação de pelo menos três antirretrovirais, resulta no controle da carga viral a níveis indetectáveis (<50 cópias/mL), permitindo a reconstituição do sistema imunológico, reduzindo a ocorrência de doenças oportunistas e melhorando a qualidade de vida dos indivíduos (LIN et al., 2011). De

acordo com os dados do Ministério da Saúde, 734 mil pessoas viviam com o HIV/aids no Brasil em 2013, e 355 mil pessoas faziam uso da HAART. Até o momento, 28 antirretrovirais foram aprovados pela agência americana de regulação, Food and Drug Administration (FDA) e atuam bloqueando diferentes etapas do ciclo do HIV incluindo: inibidores da transcriptase reversa, análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN), inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNN), inibidores de protease (IP), inibidores de integrase, inibidores de fusão e inibidores de entrada (ARTS & HAZUDA, 2012; HARTMAN & BUCKHEIT, 2012).

As mutações ocorridas durante o processo de replicação viral podem originar variantes virais com susceptibilidade reduzida aos antirretrovirais. As mutações de resistência selecionadas após o uso da terapia antirretroviral são designadas como mutações de resistência adquiridas (ADRM, do inglês, *acquired drug resistance mutations*), enquanto aquelas presentes antes do início da terapia antirretroviral são classificadas como mutações de resistência transmitidas (TDRM, do inglês, *transmitted drug resistance mutations*) (FANALES-BELASIO et al., 2010). Esta denominação corresponde com a hipótese de que indivíduos virgens de tratamento que carregam mutações de resistência aos antirretrovirais provavelmente foram infectados por cepas virais resistentes selecionadas em indivíduos que já foram submetidos a terapia antirretroviral.

O uso generalizado da terapia antirretroviral no Brasil desde 1996 conduziu a um aumento substancial no surgimento e transmissão de estirpes de HIV que carregam mutações de resistência a um ou mais agentes antirretrovirais. De acordo com estudos que caracterizaram indivíduos virgens de tratamento infectados pelo HIV provenientes de diferentes regiões do Brasil, a taxa global de TDRM aumentou de 6,6% para 12,2% ao longo dos últimos 10-15 anos (ALENCAR et al., 2013; BRINDEIRO et al., 2003; INOCENCIO et al., 2009; SPRINZ et al, 2009).

A resistência adquirida ou transmitida representa um desafio para o controle da infecção pelo HIV-1, uma vez que pode reduzir a eficácia da terapia de primeira linha. Neste sentido, o monitoramento da prevalência de ADRM e TDRM é uma ferramenta fundamental para o acompanhamento dos indivíduos sob terapia antirretroviral assim como para o estudo da transmissão de estirpes de HIV resistentes na população, respectivamente.

Quando a prevalência de TDRM numa população atinge um valor superior a 15%, a UNAIDS preconiza a implementação do teste de genotipagem pré-tratamento

para orientar a escolha do regime de HAART, reduzindo o risco de fracasso do tratamento em pessoas com vírus resistentes. O método mais usado para detecção de cepas do HIV-1 resistentes aos antirretrovirais é o teste genotípico que determina o nível de sensibilidade/resistência às diferentes classes de inibidores da população viral majoritária presente em cada paciente, por meio de sequenciamento genético do gene alvo da terapia antirretroviral e subsequente aplicação de um algoritmo de interpretação (SHAFER et al., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

A implementação de uma técnica *in house* para detecção direta do ácido nucleico do HIV pode ser importante para a confirmação da infecção pelo vírus em situações específicas tais como: exames sorológicos indeterminados, diagnóstico de infecção aguda e diagnóstico de transmissão vertical.

A subsequente caracterização molecular do vírus, particularmente dos genes alvos da terapia antirretroviral, permite gerar informações a respeito da diversidade genética do HIV assim como da prevalência de mutações de resistência aos antirretrovirais em populações de indivíduos virgens de terapia e em terapia.

A diversidade genética do HIV representa um importante desafio para o desenvolvimento de vacinas enquanto que o monitoramento de transmissão de estirpes resistentes aos medicamentos é extremamente importante para um país como o Brasil, que fornece tratamento antirretroviral gratuito para cerca de 200 mil indivíduos infectados pelo HIV, muitos dos quais têm baixos níveis de educação e pouca adesão ao tratamento.

A prevalência das diferentes variantes genéticas do HIV-1 assim como a prevalência de TDRM varia de forma importante entre as diferentes cidades e regiões do Brasil. A epidemia de Aids no Brasil tem sido estudada principalmente nos grandes centros urbanos das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, onde a epidemia encontra-se estabilizada. Existe, no entanto, pouca informação a respeito das características genéticas do HIV e da prevalência de TDRM na região Norte do país, onde a expansão da epidemia e a introdução de terapia antirretroviral são mais recentes. O Estado do Amapá, localizado no extremo Norte do país, constitui ainda um ponto geográfico singular, tanto pelo relativo isolamento dos maiores centros urbanos do país como pelo intenso fluxo migratório que ocorre pela fronteira com a Guiana Francesa. Desta forma, o Amapá pode servir como uma importante porta de entrada para a transmissão de novas formas genéticas do HIV-1. Considerando estes fatores, pesquisas fazem-se necessárias para identificar as variantes genéticas do HIV circulantes no Estado do Amapá assim como para monitorar a prevalência de TDRM na população local.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Aplicar metodologias moleculares “*in-house*” para diagnóstico e caracterização molecular do HIV em uma população de indivíduos com sorologia positiva para HIV e virgens de tratamento no Estado do Amapá.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o desempenho de metodologias moleculares “*in-house*” previamente estabelecidas para detecção do HIV no conjunto de amostras provenientes de indivíduos virgens de tratamento do Estado do Amapá.
- Determinar a diversidade genética da epidemia de HIV no Estado do Amapá.
- Calcular a prevalência de TDRM no Estado do Amapá e a probabilidade de falha da terapia de primeira linha nos indivíduos virgens de tratamento do Estado do Amapá.
- Avaliar a importância de implementar o teste de genotipagem pré-tratamento no LACEN-Amapá.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo e transversal de uma população de indivíduos portadores do HIV procedentes do Serviço de Assistência Especializada do Amapá (SAE-AP). Foram incluídos no estudo, 113 indivíduos virgens de terapia antirretroviral que realizaram os exames de contagem de células TCD4⁺ e carga viral entre outubro de 2013 e maio de 2014. Destes 113 indivíduos, foram excluídos os que possuíam idade abaixo de dois anos de idade. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz sob o número CAAE: 35785214.5.1001.5248.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas via punção venosa a vácuo no SAE-AP e encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP) em dois tubos de 5 mL contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. As amostras foram posteriormente processadas no Laboratório de Carga Viral do LACEN-AP para a realização de exames de carga viral e contagem de linfócitos T-CD4⁺/CD8⁺. O excedente de sangue total foi aliquoteado em dois tubos estéreis de 1 mL, identificados conforme um código alfanumérico, e armazenados em refrigerador com temperatura de -20°C. As amostras foram posteriormente encaminhadas para o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular (LABAIDS) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) para a realização da extração e amplificação do DNA viral utilizando metodologia de genotipagem *in house* já padronizada pelo LABAIDS, assim como para a subsequente caracterização molecular do vírus (ANEXO A).

4.3 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL

O DNA celular foi extraído a partir do sangue total utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), conforme indicação do fabricante. O DNA viral integrado no genoma (provírus) foi posteriormente amplificado pela metodologia de *nested* PCR com amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,200 pb do gene *pol* do HIV. Os iniciadores externos utilizados foram G17S/MMRT6 e como iniciadores internos MMRT5/MMRT10 (Tabela 1). As duas etapas da PCR foram

realizadas em volume final de 50µL cada, contendo 1X GeneAmp PCR buffer (Tris-HCl pH 9,0; 50mM NaCl; 5mM MgCl₂, Applied Biosystems, EUA), 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 0,3mM de dNTPs (Invitrogen, EUA), 0,35µM de cada iniciador (senso e antissenso) para cada etapa (Tabela 1), 1,5U de AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, EUA), 5µl do DNA de cada amostra, e água DEPC (Invitrogen, EUA) até o volume final de 50µL. As condições de ciclagem foram idênticas para as duas etapas: 3 ciclos de 97°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos por 32 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e uma fase final de extensão de 72°C por 10 minutos. Para análise amplificação do fragmento de 1200pb, foram aplicados 5µL do produto da segunda reação mais 1µL do corante azul de bromofenol [azul de bromofenol 28%, EDTA 10mM pH8,0 e sacarose 40%] em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,001%. As amostras foram submetidas à eletroforese (80 Volts por 1 hora e 30 minutos) utilizando TBE1x [Tris-HCl 1M, Ácido bórico 1M e EDTA 20mM] como tampão de corrida. Todas as reações foram monitoradas com uso de controles positivos e negativos.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento do gene *pol* do HIV.

| Iniciador | Sequência (5' →3') | Etapa |
|-----------|--------------------------|-------------------------------|
| G17S | AAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGA | PCR 1° Round |
| MMRT6 | TTTTACATCATTAGTGTGGG | |
| MMRT10 | CAGGCTAATTTTTAGGGAA | PCR 2° Round e sequenciamento |
| MMRT5 | TAAATTTGATATGTCCATTG | |
| RT4 | AGTTCATAMCCCATCCA | Sequenciamento |
| RT9 | GTACAGTRTTAGTAGGACCTACA | |
| LR51 | ATGTGGTATTCTAATTGAACYTCC | |
| SEQRT | GGATGGAAAGGATCACCAGCAA | |

4.4 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES PR E RT DO GENE *pol* DO HIV.

Os produtos de PCR foram purificados para o uso nas reações de sequenciamento pelo método cromatográfico, com o uso de colunas de purificação utilizando-se o Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Inglaterra) seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento das regiões PR e RT do gene *pol* do HIV (posições 2253-3272 do HXB2) foi realizado utilizando-se o kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied

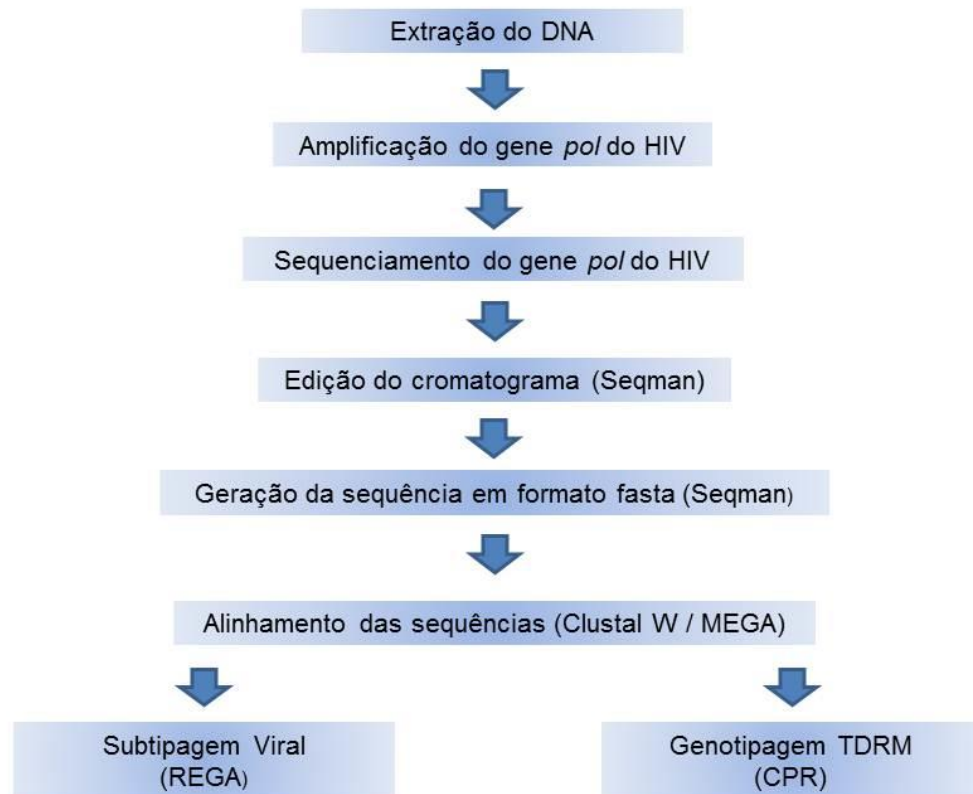
Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento de cada amostra foram utilizados seis iniciadores (Tabela 1) com concentração final de 0,2 μ M e aproximadamente 30ng de DNA purificado. As condições de termociclagem de sequenciamento foi de: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. As amostras foram posteriormente encaminhadas para a Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz e sequenciadas no sequenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO HIV

As sequências de nucleotídeos do HIV obtidas foram editadas usando o software SeqMan 4.0 (DNASTAR Inc, EUA), e posteriormente alinhadas. Para a realização do alinhamento das sequências foi utilizado o programa ClustalW incluído no pacote MEGA 4.0 (TAMURA, PETERSON D, PETERSON N, 2011). A determinação do subtipo viral foi realizada com o uso do software online *REGA HIV Automated Subtyping Tool* v2.0 (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/>) (DE OLIVEIRA, DEFORCHE, CASSOL, 2005).

A prevalência de TDRM foi calculada utilizando a ferramenta online *Calibrated Population Resistance* (CPR) v6.0 que utiliza o painel de vigilância de mutações de resistência primária de 2009 disponível na base de dados da Universidade de Stanford: *HIV Drug Resistance Database* (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>) (GIFFORD, LIU, RHEE, 2009). (Figura 14)

Figura 14. Fluxograma do desenho experimental do presente projeto.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS INDIVÍDUOS.

A mediana do número de células TCD4⁺ da presente casuística foi de 370 células/ μ l distribuída da seguinte forma: 35% com menos de 200 células/ μ l, 31% com 201-500 células/ μ l, e 34% com mais de 500 células/ μ l. A mediana de carga viral (RNA) plasmática da casuística analisada foi de 12.138 cópias/ml distribuída da seguinte forma: 15% abaixo de 1.000 cópias/ml, 31% entre 1.000-10.000 cópias/ml, 29% entre 10.001-100.000 cópias/ml, e 25% acima de 100.000 cópias/ml.

A maior parte dos indivíduos incluídos no presente estudo eram do sexo masculino (62%) (Figura 12) e estão agrupados nas faixas etárias de 20-29 anos (33%) e de 30 a 39 anos (31%) (Figura 13). A média de idade da população de estudo foi de 33 anos (intervalo de 15 a 72 anos), com valores similares para homens (média de 31 anos, intervalo de 15 a 72 anos) e mulheres (média de 34 anos, intervalo de 17 a 56 anos). As distribuições por sexo e faixa etária observadas nos indivíduos reproduzem as distribuições observadas para o total da população de indivíduos diagnosticados com HIV no Estado do Amapá no período de 2007 a 2013, segundo dados da Coordenação de DST/Aids e Hepatites Virais (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Distribuição dos indivíduos infectados pelo HIV-1 quanto ao sexo analisados na nossa casuística (LACEN-AP) e notificados na Coordenação DST/AIDS no Amapá durante o período 2007-2013.

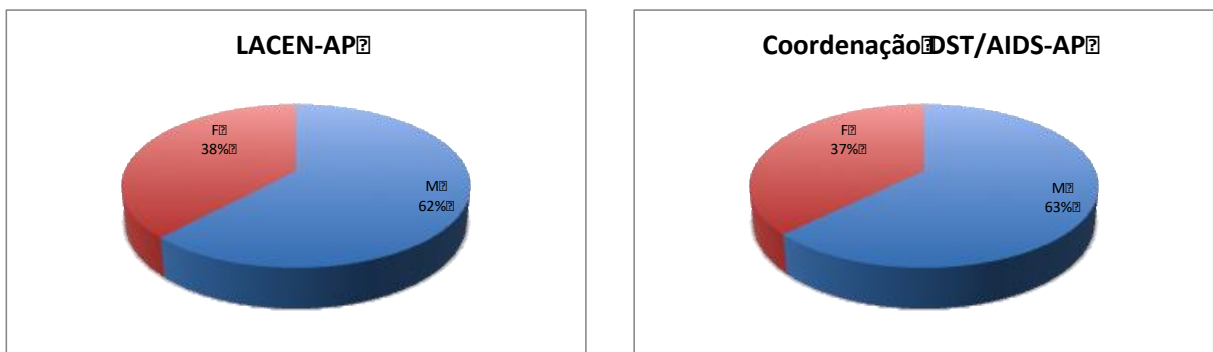
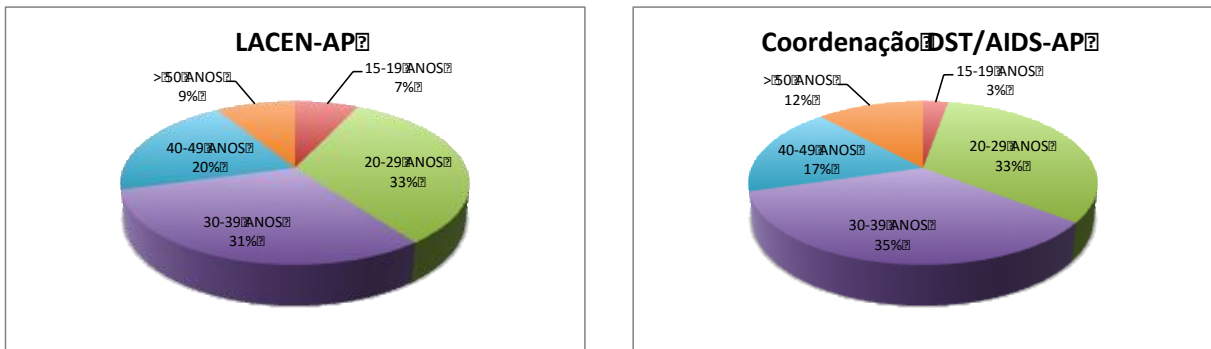


Figura 16. Distribuição por faixa etária dos indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados na presente casuística (LACEN-AP) e notificados na Coordenação DST/AIDS no Amapá durante o período 2007-2013.



No presente estudo foram incluídos indivíduos que residiam em 12 dos 16 municípios do Amapá, incluindo nove das 10 cidades do Amapá com maior número de habitantes (Figura 17). Aproximadamente dois terços (76%) dos indivíduos incluídos neste estudo foram provenientes da região Metropolitana, que inclui a capital Macapá e o município vizinho de Santana (Figura 15). Estes são os municípios que concentram a maior parte da população do estado (75%), assim como a maior parte dos indivíduos diagnosticados com HIV (82%) segundo informação da coordenação de DST/aids e Hepatites Virais do Amapá (Figura 18). Quando comparada com a população do estado, foi observada uma proporção maior de indivíduos provenientes da região Sul do estado, enquanto a região Norte estaria ligeiramente sub-representada da presente casuística.

Figura 17. Distribuição geográfica dos indivíduos HIV-positivos incluídos no estudo segundo o município de residência.

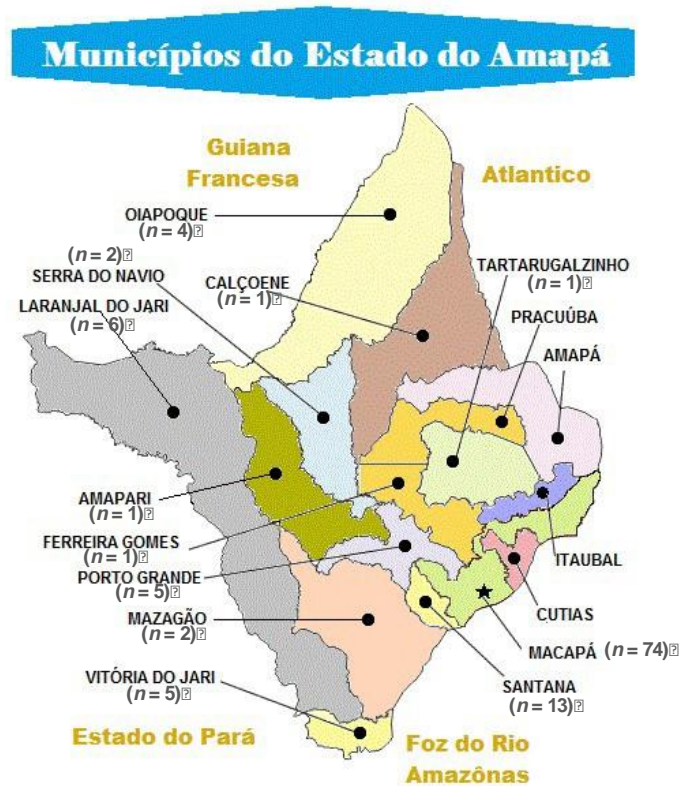
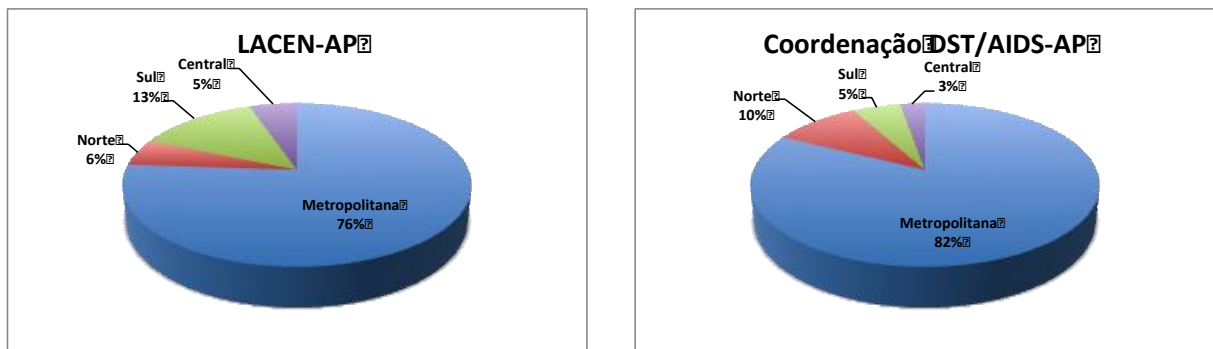


Figura 18. Distribuição por município de residência dos indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados na nossa casuística (LACEN-AP) e notificados na Coordenação DST/AIDS no Amapá durante o período 2007-2013.



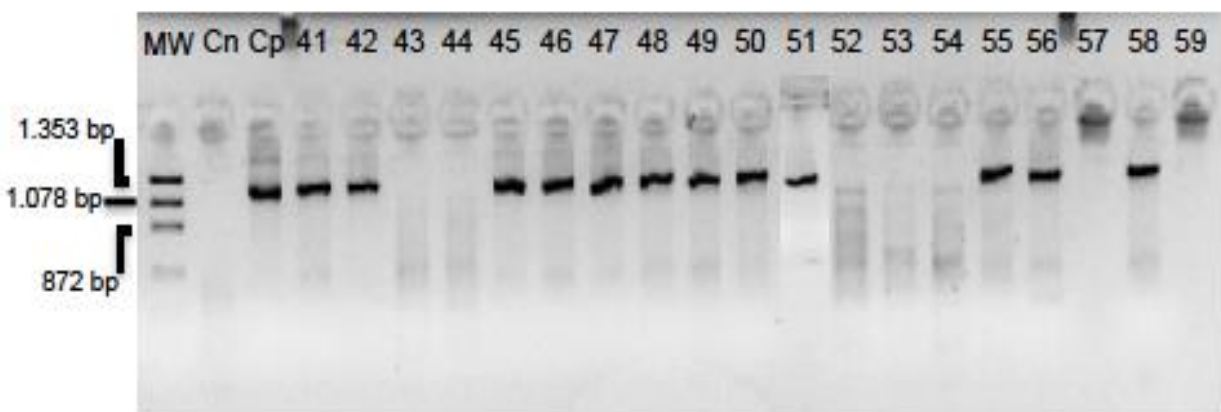
Os dados laboratoriais sugerem que uma proporção importante dos indivíduos virgens de terapia incluídos no estudo teria indicação de tratamento antirretroviral considerando o baixo número de células TCD4⁺ (66% com menos de 500 células/ μ l) e alta carga viral plasmática (54% com mais de 10.000 cópias/ml) apresentados. Esta observação seria compatível com um diagnóstico tardio da infecção pelo HIV, próximo ou durante a fase de aids, para uma importante fracção dos indivíduos o que pode

comprometer a eficácia de um futuro tratamento antirretroviral. A alta proporção homem/mulher (1,6) observada no momento da investigação sugere também que a população masculina do Amapá apresenta um risco de infecção pelo HIV mais elevado do que a população feminina, o que poderia estar relacionado a uma maior exposição dos homens ao vírus e/ou a uma menor preocupação no que se diz respeito à proteção da infecção. Finalmente, estas análises indicam que a casuística incluída neste estudo representa uma amostra representativa da população de indivíduos infectados pelo HIV no estado do Amapá no que refere a sexo, faixa etária e distribuição geográfica.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *POL* DO HIV

Um fragmento de aproximadamente 1.200 nucleotídeos do gene *pol* do HIV foi amplificado pela metodologia de *NESTED-PCR*, a partir do DNA viral integrado no genoma celular (provírus). Das 113 amostras analisadas, 97 (86,0%) tiveram um produto amplificado do tamanho esperado (Figura 19). Este percentual de positividade obtido para as amostras do Amapá é comparável ao descrito para outros estudos desenvolvidos no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular utilizando a mesma metodologia de *NESTED-PCR* em coortes de indivíduos com sorologia positiva para HIV provenientes do Rio de Janeiro (88-91%) (Velasco de Castro, 2006; Pilotto, 2008) e Santa Catarina (82%) (GRAFF, 2011).

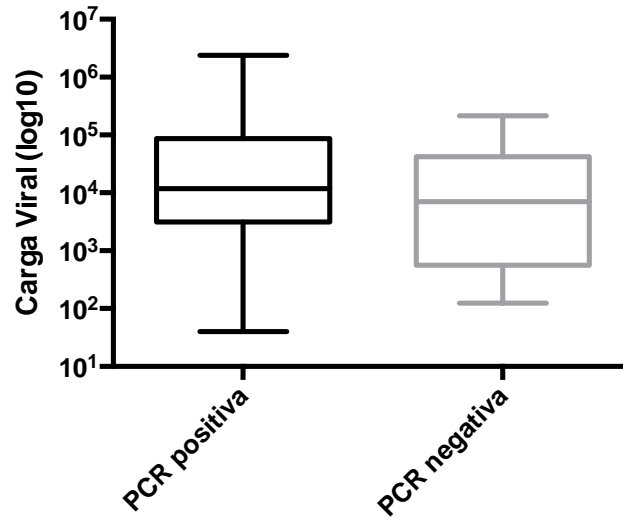
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos da amplificação por PCR do gene *pol* do HIV. MW (marcador de peso molecular), Cn (controle negativo), Cp (controle positivo), 41-59 (amostras amplificadas).



A falta de reatividade da PCR para amplificação do DNA proviral a partir de indivíduos com sorologia positiva para o HIV podem ser explicadas por:

- 1) Falha durante a extração do DNA. O DNA das amostras negativas foi extraído e amplificado simultaneamente com o DNA de amostras positivas o que descartaria qualquer problema no processo de extração do DNA. No entanto, seria necessária a realização de uma PCR controle para amplificação de genes do hospedeiro para descartar completamente qualquer problema na integridade do DNA extraído.
- 2) Falha na etapa de anelamento dos iniciadores ao DNA alvo. Os iniciadores usados na *NESTED-PCR in house* foram desenvolvidos para detectar todos os subtipos do HIV-1, e particularmente aqueles mais prevalentes na população brasileira. No, entanto, polimorfismos pontuais podem afetar a eficiência de anelamento e novas PCR com outros conjuntos de iniciadores deverão ser realizadas para descartar esta hipótese.
- 3) Carga proviral abaixo do limite de detecção da técnica. Indivíduos com um maior controle natural da replicação viral apresentam baixos níveis de RNA plasmático e de DNA proviral, dificultando a detecção do vírus. No entanto, o valor de mediana assim como o intervalo de carga viral plasmática observado para o grupo de indivíduos com PCR positiva (média 11.873 cópias/ml, mínimo 40 cópias/ml, máximo 2.4×10^6 cópias/ml) foram similares aos observados no grupo com PCR negativa (média 7.044 cópias/ml, mínimo 124 cópias/ml, máximo 215.086 cópias/ml) (Figura 20). Isto sugere que a baixa carga proviral não seria o principal fator responsável pela falta de amplificação na *NESTED-PCR*.

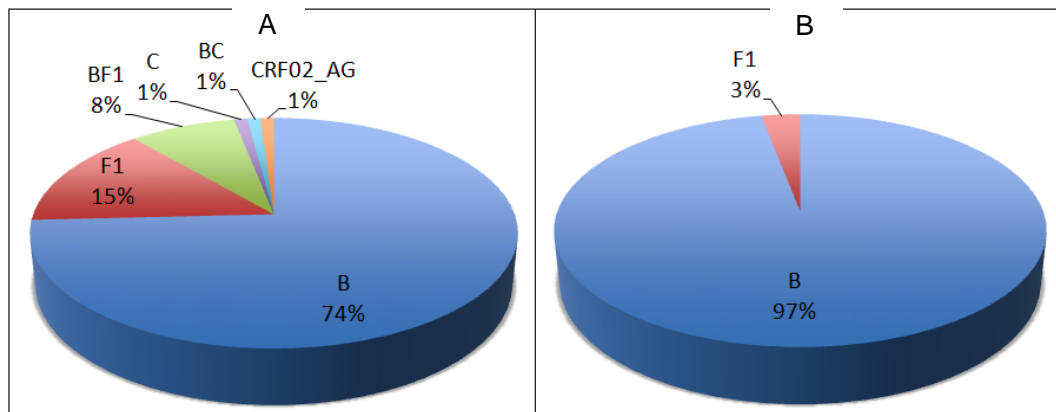
Figura 20. Mediana, intervalos interquartis 25-75, mínimo e máximo de carga viral plasmática nos grupos de indivíduos com PCR positiva e negativa.



5.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 NO AMAPÁ

A análise das 97 amostras amplificadas revelou a presença dos subtipos B, C e F1, assim como formas recombinantes BF1, BC e CRF02_AG. A forma genética mais prevalente do HIV-1 na população do Amapá foi o subtipo B (74%), seguido pelo subtipo F1 (15%), BF1 (8%), C (1%), BC (1%) e CRF02_AG (1%) (Figura 21A). As variantes B, F1 e BF1 foram detectadas tanto na metropolitana (Macapá e Santana), bem como nas pequenas cidades do interior do Estado. O subtipo C e o CRF02_AG foram detectados na capital Macapá, ao passo que a variante BC foi detectada na cidade mais setentrional do Brasil, Oiapoque, localizada na fronteira com a Guiana Francesa.

Figura 21. Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 estimados para a população de Amapá no presente trabalho (A) e no estudo de Machado *et al* (2009) (B).



A diversidade viral detectada no Amapá no presente trabalho é comparável com aquela encontrada nas grandes metrópoles brasileiras das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste onde a epidemia de HIV é também caracterizada pelo predomínio dos subtipos B, F1 e recombinantes BF1 (ALENCAR *et al*, 2013; BELLO, SOARES, SCHRAGO, 2011; BRINDEIRO *et al*, 2003; INOCENCIO *et al*, 2009; SPRINZ *et al*, 2009). A diversidade genética detectada na presente investigação é muito mais elevada do que a previamente descrita por Machado e colaboradores (2009) numa população de indivíduos com sorologia positiva para o HIV recrutados no Amapá em 2002 (Figura 18B). A diferença encontrada com o estudo anterior pode ter resultado de:

- 1) Diferenças no tamanho da casuística analisada. O estudo de Machado e colaboradores analisou um número muito menor de indivíduos ($n = 35$) quando comparado ao estudo sob análise ($n = 97$) o que pode ter dificultado a detecção de variantes minoritárias como subtipo C e recombinantes BC e CRF02_AG.
- 2) Diferenças nos fragmentos do HIV-1 analisados. O estudo de Machado e colaboradores analisou fragmentos gênicos das regiões *pol* (290 nucleotídeos) e *env* (500 nucleotídeos) de tamanho muito menor ao fragmento de *pol* analisado no presente estudo (1.200 nucleotídeos), que demonstrou ser o fragmento mais apropriado para detecção de genomas recombinantes do HIV (PASSAES *et al*, 2009).
- 3) Um aumento da diversidade genética da epidemia de HIV-1 no Amapá ao longo do tempo. A diversidade genética da epidemia no Amapá pode ter se incrementado na última década como consequência de uma contínua introdução de novas variantes

oriundas de outros estados ou até de outros países para o Amapá.

O subtipo C e os recombinantes BC são as formas genéticas do HIV-1 mais prevalentes nos estados da região Sul do Brasil. Alguns estudos anteriores tinham demonstrado uma expansão destas variantes para estados das regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte (GRAF & PINTO, 2013) o que vem a ser corroborado pelo presente estudo. Este estudo também confirma a circulação no Amapá da variante CRF02_AG que é altamente prevalente na África Ocidental e Central, mas raramente detectada no Brasil. A variante CRF02_AG foi anteriormente detectada em alguns poucos indivíduos do Rio de Janeiro (DELATORRE et al, 2012; EYER-SILVA & MORGADO, 2007; VELASCO DE CASTRO et al, 2014) e São Paulo (FERREIRA et al, 2013; SANABANI et al, 2011) e num único indivíduo de Belém, Pará (MACHADO et al, 2009).

5.4 RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS INDIVÍDUOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1

O estudo da distribuição das variantes do HIV em relação aos dados epidemiológicos dos pacientes revelou uma maior proporção do subtipo B em mulheres (83%) do que em homens (69%) (Figura 22), em indivíduos com menos de 25 anos (83%) do que em indivíduos com mais de 35 anos (68%) (Figura 23), e em indivíduos do interior do Estado (86%) do que indivíduos da região Metropolitana (71%) (Figura 24).

Figura 22. Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em indivíduos de sexo masculino e feminino.



Figura 23. Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em indivíduos com diferentes faixas etárias.

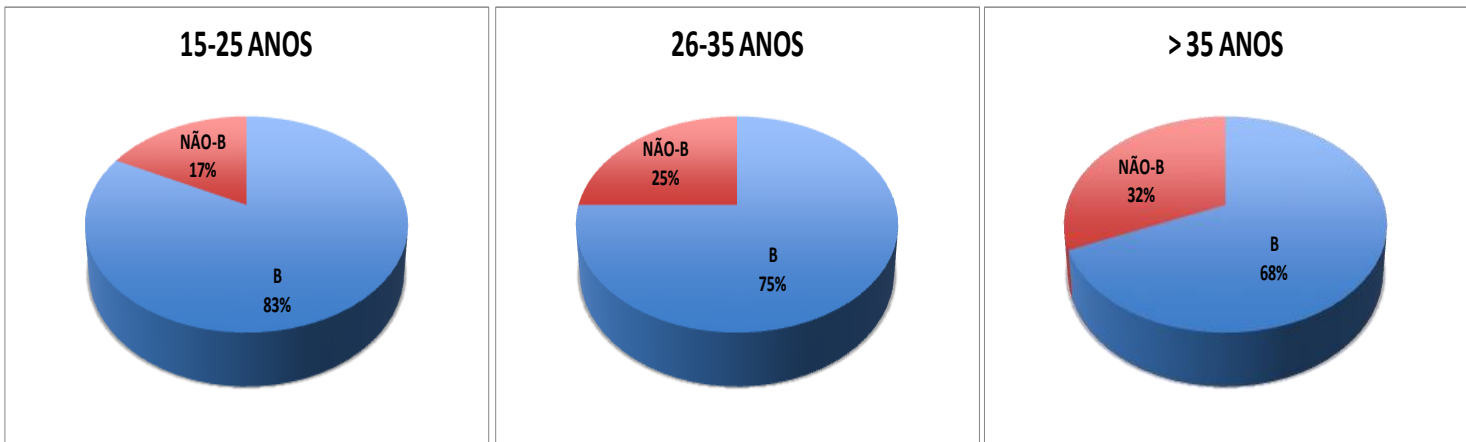


Figura 24. Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em indivíduos provenientes da região metropolitana (Macapá/Santana) e de outras cidades do interior do Estado.

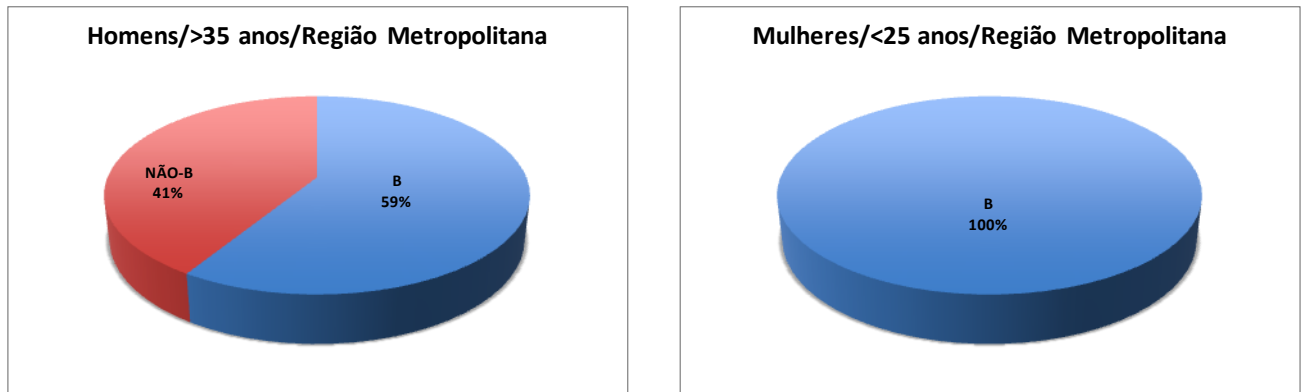


Quando os fatores epidemiológicos foram analisados de forma combinada foi observado que a proporção do subtipo B na região metropolitana diminuiu de 100% entre mulheres jovens para 59% entre homens maiores de 35 anos (Figura 25).

Este resultado sugere que o subtipo B seja a principal variante genética associada à disseminação do HIV entre indivíduos jovens heterossexuais, enquanto que as variantes não-B estariam mais associadas a redes de transmissão entre homens que fazem sexo com homens (HSH) mais velhos. O tamanho da casuística em estudo, no entanto, não permite uma comparação estatística apropriada e algumas das diferenças observadas poderiam resultar de variações estocásticas devido ao pequeno tamanho amostral. Para comprovar a hipótese anteriormente formulada será

necessário determinar o subtipo do HIV em um maior número de indivíduos de diferentes categorias de exposição do Estado do Amapá.

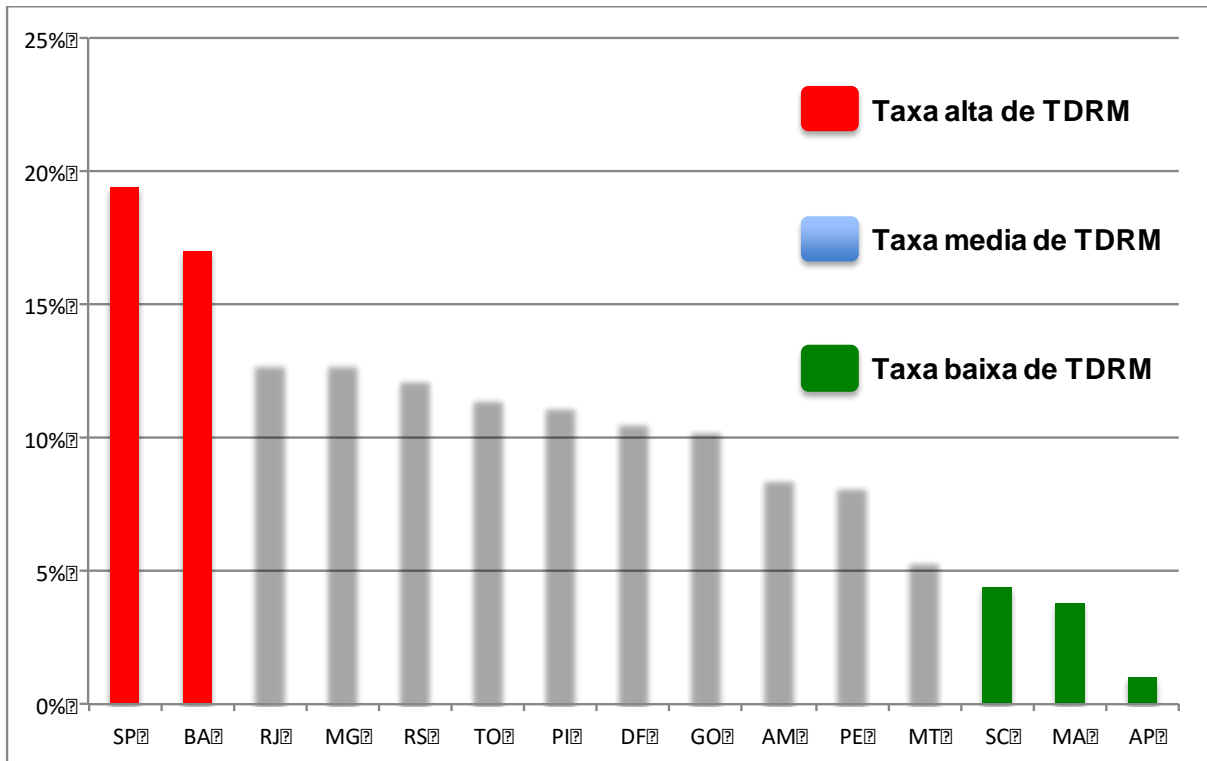
Figura 25. Distribuição do subtipo B e formas não-B (F1/BF1/C/BC/CRF02_AG) do HIV-1 em homens e mulheres de diferentes faixas etárias provenientes da região metropolitana (Macapá/Santana).



5.5 ANÁLISES DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA

A partir das sequências das regiões PR/RT foi analisada a presença de TDRM para ITRN, ITRNN e IP utilizando a ferramenta online *Calibrated Population Resistance* (CPR) v6.0. Dentre todas as sequências analisadas, apenas uma mutação de resistência a ITRNN (K103N) foi detectada em um único paciente levando a uma redução da suscetibilidade de 3-10 vezes para nevirapine, de 1-5 vezes para efavirenz, e de duas vezes para etravirine e rilpivirine. Nenhuma mutação de resistência aos ITRN e IP foi detectada na população de estudo. O nível extremamente baixo de TDRM (1%) observado no Amapá contrasta claramente com pesquisas mais recentes que mostraram um nível intermediário/elevado (5-20%) de TDRM em cidades de médio e grande porte do Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), Norte (Pará e Tocantins), Nordeste (Recife e Piauí) e Centro-Oeste (Brasília, Goiânia e Mato Grosso) (ALENCAR et al, 2013; CARDOSO, QUEIROZ, STEFANI, 2009; CARVALHO et al, 2011; FERREIRA et al, 2011; 2013; INOCENCIO et al, 2009; MOURA et al, 2015; SPRINZ et al, 2009) (Figura 26).

Figura 26. Comparação da taxa de TDRM estimada em indivíduos provenientes de diferentes estados do Brasil.



A baixa taxa de TDRM observada no Amapá pode estar associada a:

- 1) Alta ou baixa adesão ao tratamento antirretroviral nos indivíduos em terapia o que levaria a uma baixa frequência de falha virológica ou a uma baixa pressão seletiva de mutações de resistência, respectivamente.
- 2) Baixo número de indivíduos em tratamento como consequência de um baixo acesso a TARV ou a uma introdução mais tardia da TARV em áreas localizadas longe dos principais centros urbanos brasileiros. Neste caso, seria de esperar um aumento na taxa de TDRM com o tempo no estado do Amapá, como tem sido observado em outros estados brasileiros.

Estes dados reforçam a necessidade de um melhor acompanhamento da população de pacientes em terapia antirretroviral no Amapá. Portanto, conhecer o número de indivíduos em tratamento antirretroviral, o tempo médio de tratamento, a proporção de indivíduos tratados com falha virológica, e a prevalência de mutações de resistência adquirida nos indivíduos tratados será de fundamental importância para entender as principais causas da baixa taxa de TDRM observada neste estudo no Estado do Amapá.

6. CONCLUSÕES

- A metodologia de *NESTED-PCR in-house* mostrou uma eficiência elevada (86%) na amplificação do vírus a partir de amostras de sangue periférico provenientes de indivíduos virgens de tratamento do Estado do Amapá.
- A complexidade genética da epidemia do HIV-1 no Amapá é muito elevada e comparável à descrita nas grandes cidades brasileiras, caracterizada pela co-circulação de subtipos B, F1, C e diversas formas recombinantes, incluindo subtipos B/F1, B/C e A/G.
- A alta complexidade genética do HIV-1 detectada no Amapá é consistente com múltiplas introduções independentes do vírus no Estado.
- A epidemia de HIV no Amapá caracteriza-se por uma das mais baixas taxas de TDRM (1%) descrita até o momento no Brasil.
- Não existe a necessidade de se implantar o teste de genotipagem pré-tratamento no LACEN-Amapá, mas reforça a importância de manter uma vigilância epidemiológica contínua para detecção de futuros aumentos na prevalência de TDRM no Amapá.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, C.S.; SABINO, E.C.; CARVALHO, S.M.; LEAO, S.C.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CAPUANI, L.; OLIVEIRA, CL.; CARRICK, D.; BIRCH, R.J.; KEATING, S.; SWANSON, P.A.; GONÇALEZ, T.T.; HACKETT, J.; BUSCH, M.P. 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**, v.63, n.3, p.387-392, 2013.

ARTS, E.J.; HAZUDA, D.J. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.2, n.4, 2012.

BARRE-SINOUSI, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGET, C.; AXLER-BLIN, C.; VÉZINET-BRUN F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v.220, n.4599, p.868-71, 1983.

BELOTO, N. **Pacientes co-infectados com HIV e Hepatite B e/ou C; aspectos clínicos, epidemiológicos, subtipagem do HIV-1 e impacto na evolução clínica para a AIDS**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2014.

BELLO, G.; SOARES, M.A.; SCHRAGO, C.G. The Use of Bioinformatics for Studying HIV Evolutionary and Epidemiological History in South America. **AIDS Res Treat**, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria SVS/MS No 51, de 14 de outubro de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2009. Seção 1, p.40-43. Disponível em:<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS873A3DC1ITEMIDFB46666CCC844CD687CFA1933D73E118PTBRIE.htm>. Acesso em: 25/01/2015

BRINDEIRO, R.M.; DIAZ, R.S.; SABINO, E.C.; MORGADO, M.G.; PIRES, I.L.; BRIGIDO, L.; DANTAS, M.S.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P.R.; TANURI, A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **Aids**, v.17, n.7, p.1063-1069. 2003.

CARDOSO, L.P.; QUEIROZ, B.B.; STEFANI, M.M. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. **J Clin Virol.**, v.46, n.2, p.134-139, 2009.

CARVALHO, B.C.; CARDOSO, L.P.; DAMASCENO, S.; STEFANI, M.M. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland North State of Tocantins. Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses.**; v.27, n.10, p.1081-1087, 2011.

CDC. **Centers for Diseases Control and Prevention. Pneumocystis pneumonia- Los Angeles**. MMWR, 30: 250-252, 1981.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia cases among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California.** *MMWR*, 31: 305-307, 1982.

DE OLIVEIRA, T.; DEFORCHE, K.; CASSOL, S.; SALMINEN, M.; PARASKEVIS, D.; SEEBREGTS, C.; SNOECK, J.; VAN RENSBERG, E.J.; WENSING, A.M.; VAN DE VIJVER DA.; BOUCHER, C.A.; CAMACHO, R.; VANDAMME, A.M. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics*; Morgado, v.21, n.19, p.3797-3800, 2005.

DELATORRE, E.O.; BELLO, G.; EYER-SILVA, W.A.; CHEQUER-FERNANDEZ, S.L.; COUTO-FERNANDEZ, J.C. Evidence of multiple introductions and autochthonous transmission of the HIV type 1 CRF02_AG clade in Brazil. ***AIDS Res Hum Retroviruses***, v.28, n.10, p.1369-1372, 2012.

EYER-SILVA, W.A.; MORGADO, M.G. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***, v.102, n.7, p.809-815. 2007.

FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B.; BUTTÒ, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. ***Ann. Ist. Super. Sanita***, v.46, n.1, p.5–14, 2010.

FERREIRA, A.S.; CARDOSO, L.P.; STEFANI, M.M. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. ***J Med Virol***, v.83, n.8, p.1301-1307, 2011.

FERREIRA, J.L.; RODRIGUES, R.; LANÇA, A.M.; DE ALMEIDA, V.C, ROCHA, S.Q.; RAGAZZO, T.G.; ESTEVAM, D.L.; BRIGIDO, L.F. Transmitted Drug Resistance among People Living with HIV/Aids at Major Cities of Sao Paulo State, Brazil. ***Adv Virol***, 2013.

GIFFORD, R.J.; LIU, T.F.; RHEE, S.Y.; KIUCHI, M.; HUE, S.; DEENAN PILLAY, D.; SHAFER, R.W. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. ***Bioinformatics***, v.25, n.9, p.1197-1198, 2009.

GRAFF, T. **Epidemiologia molecular do HIV-1 e resistência primária a antirretrovirais em indivíduos soropositivos da região metropolitana de Florianópolis/SC.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

GRAFF, T.; PINTO, A.R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. ***Virology***, v.435, n.1, p.170-178, 2013.

GUPTA, V.; GUPTA, S. Laboratory markers associated with progression of HIV infection. ***Indian J Med Microbiol***, v. 22, n. 1, p. 7-15, 2004.

HARTMAN, T.L.; BUCKHEIT, R.W. The Continuing Evolution of HIV-1 Therapy: Identification and Development of Novel Antiretroviral Agents Targeting Viral and Cellular Targets. **Mol. Biol. Int.**:401965. 2012.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P.D.; OSMANOV, S. WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **AIDS**, v.25, n.5, p.679-89, 2011.

INOCENCIO, L.A.; PEREIRA, A.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; FERNANDEZ, J.C.C.; JORGE, C.P.; SOUZA, D.F.C.; FINK, H.T.; DIAZ, R.S.; BECKER, I.M.; SUFFERT, T.A.; ARRUDA, M.B.; MACEDO, O.; SIMÃO, M.B.G.; TANURI, A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J Int AIDS Soc**, p.12-20, 2009

KORBER, B.; MULDOON, M.; THEILER, J.; GAO, F.; GUPTA, R. LAPEDES, A.; HAHN, B.H.; WOLINSKY, S.; BHATTACHARYA, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**, v.288, n.5472, p.1789-1796, 2000.

LIN, D.; SEABROOK, J.A.; MATSUI, D.M.; KING, S.M.; RIEDER, M.J.; FINKELSTEIN, Y. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 20, n.12, p.1246-1252, 2011.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 2, p. 147-160, 2009.

MACÊDO, O. **Caracterização molecular da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com aids e prevalência de subtipos do HIV-1 nos estados Pará e Amazonas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará, 2010.

MACHADO, L.F.; ISHAK, M.O.; VALLINOTO, A.C.; LEMOS, J.A.; AZEVEDO, V.N.; MOREIRA, M.R.; SOUZA, M.I.; FERNANDES, L.M.; SOUZA, L.L.; ISHAK, R. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. **AIDS Research Human Retroviruses**, v.25, n.10, p.961-966, 2009.

MANAVI, K. A review on infection with human immunodeficiency virus. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.20, n.6, p.923-40, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde-Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. BRASIL. **Boletim Epidemiológico AIDS - DST**. Ano VIII-Nº 01, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde-Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. BRASIL. **Relatório de Saúde do Amapá**. Ed 5º Brasília- DF, 2011b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde-Departamento de

DST, Aids e Hepatites Virais. BRASIL. **Boletim Epidemiológico AIDS - DST**. Ano II-Nº 01, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde-Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. BRASIL. **Manual Técnico para o diagnóstico da Infecção pelo HIV**. 2013b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde-Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. BRASIL. **Boletim Epidemiológico AIDS E DST**. Ano III-Nº 01, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde-Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Coordenação Estadual de DST e Aids. BRASIL. **Implantação do Serviço de Atendimento Especializado em HIV e AIDS (SAE) nos municípios de Macapá, Santana, Laranjal do Jari, Amapá, Oiapoque e Pedra Branca do Amapari**. 2014b.

MOURA, M.E.; DA GUARDA, R.M.N.; LIMA, Y.A.; EULALIO, K.D.; CARDOSO, L.P.; STEFANI, M.M. HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. **J Med Virol**, v.87, n.5, p.798-806, 2015.

MUESING, M.A.; SMITH, D.H.; CABRADILLA, C.D.; BENTON, C.V.; CAPON, D.J. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. **Nature**, v.313, p.450-458, 1985.

PASSAES, C.P.; BELLO, G.; LORETE, R.S.; MATOS ALMEIDA, S.E.; JUNQUEIRA, D.M.; VELOSO, V.G.; MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. **Infect Genet Evol**, v.9, n.4, p.474-482, 2009.

PEÇANHA, E.P.; ANTUNES, O. A. C.; Estratégias farmacológicas para a terapia anti-aids. **Quím. Nova**, v. 25, n.6B, p. 1108-1116, 2002.

PILOTTO, J.E. **Perfil de resistência genotípica do HIV-1 aos antirretrovirais em uma população de mulheres infectadas pelo HIV expostas a quimioprofilaxia com antirretrovirais para prevenção da transmissão vertical do HIV-1 durante a gestação**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI/FIOCRUZ, 2011.

POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M. G.; READ, E.; GALLO, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science**, v.224, n.4648, p. 497-500, 1984

ROBERTSON, D.L.; ANDERSON, J.P.; BRADAC, J.A.; CARR, J.K.; FOLEY, B.; FUNKHOUSER, R.K.; GAO, F.; HAHN, B.H.; KALISH, M.L.; KUIKEN, C.; LEARN, G.H.; LEITNER, T.; MCCUTCHAN, F.; OSMANOV, S.; PEETERS, M.; PIENIAZEK, D.; SALMINEN, M.; SHARP, P.M.; WOLINSKY, S.; KORBER, B. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v.288, p.5463, p.55-56, 2000.

SANABANI, S.S.; PASTENA, É.R.; DA COSTA, A.C.; MARTINEZ, V.P.; KLEINE-NETO, W.; DE OLIVEIRA, A.C.; SAUER, M.M.; BASSICHETTO, K.C.; OLIVEIRA, S.M.; TOMIYAMA, H.T.; SABINO, E.C.; KALLAS, E.G. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v.6, n.10, 2011.

SARNGADHARAN, M. G.; POPOVIC, M.; BRUCH, L.; SCHUPBACH, J.; GALLO, R. C. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. **Science**, v.224, n.4648, p.506-508, 1984.

SHAFER, R.W, DUPNIK, K.; WINTERS, M.A.; ESHLEMAN, S.H. **A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies**. HIV Seq. Compendium, p.1-51, 2001.

SHARP, P. M.; ROBERTSON, D. L.; HAHN, B. H. Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.349, n.1327, p.41-47, 1995.

SIMON, V.; HO, D. D.; KARIM, Q. A. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v.368, n.9534, p.489-504, 2006.

SPRINZ, E.; NETTO, E.M.; PATELLI, M.; LIMA, J.S.; FURTADO, J.J.; DA EIRA, M.; ZAJDENVERG, R.; MADRUGA, J.V.; LEWI, D.S.; MACHADO, A.A.; PEDRO, R.J.; SOARES, M.A. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.25, n.9, p.861-867, 2009.

STEFFY, K; STALL, F. W. Genetic regulation of human immunodeficiency virus. **Am Soc microbiol**, v.55, n.2, p 193-205, 1991.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol**, 2011.

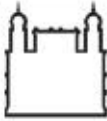

UNAIDS. **Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic**. UNAIDS. Disponível em: <http://www.unaids.org.br>. 2013.

VELASCO DE CASTRO, C.A. **Avaliação da incidência, prevalência, perfil sócio-demográfico e subtipagem da infecção pelo HIV-1 em populações testadas nos centros de testagem e aconselhamento no Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI/FIOCRUZ. 2006.

VELASCO DE CASTRO, C.A.; GRINSZTEJN, B.; VELOSO, V.G.; BASTOS, F.I.; PILOTTO, J.H.; FERNANDES, N.; MORGADO, M.G. HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v.9, n.1, 2014.

VERONESE, F.D.; DE VICO, A.L.; COPELAND, T.H.; OROSZLAN, S.; GALLO, R.C.; SAMGADHARAN, M.G. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV- III/LAV envelope gene. **Science**, v.229, p.1402-1405, 1985.

ANEXO A – POP GENOTIPAGEM DE PROTOCOLO *IN HOUSE*.

| | | | |
|---|--|---|---|
|  | Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz |  LabAids Laboratório de Aids e Imunologia Molecular | Pavilhão Leônidas Deane, 4ª e 5ª andares, salas 413, 415 e 501. Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro - RJ, CEP 21045-900. Tel: +55- 21 3865-8154/3865-8106/3865-8130/3865-8173 (fax) www.ioc.fiocruz.br lab aids@ioc.fiocruz.br |
|---|--|---|---|

| | | |
|--|--------------------------------|----------------------|
| Título do POP Genotipagem Protocolo "in house" | Código: LabAids 017P | Versão 3.0 |
|--|--------------------------------|----------------------|

Histórico

| Versão | Criado por/ Data | Modificado por/ Data | Revisado por/ Data | Aprovado por | Data efetiva |
|---|---------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| 1.0 | Carlos Silva | | José Carlos | Mariza Morgado | 18/11/2009 |
| 2.0 | | | Carlos Silva | Monick L. Guimarães | 15/11/2010 |
| 2.0 | | Carlos Silva | José Carlos | Monick L. Guimarães | 09/08/2011 |
| 2.0 | | | Carlos Silva | Monick L. Guimarães | 08/08/2012 |
| 3.0 | | Carlos Silva | José Carlos | Monick L. Guimarães | 15/02/2013 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Próxima revisão: após 1 ano da última aprovação | | | | | |

| Sumário | Página |
|---|--------|
| 1.0 – Objetivos / Campo de aplicação | 02 |
| 2.0 – Siglas e Definições | 02 |
| 3.0 – Descrição/Procedimento | 02 |
| 4.0 – Não conformidade e ação corretiva | 08 |
| 5.0 – Manutenção e validação | 08 |
| 6.0 – Descrição da modificação | 08 |
| 7.0 – Anexos | 08 |
| 8.0 – Referências | 12 |
| 9.0 – De acordo com o POP | 12 |

1.0 Objetivo / Campo de Aplicação:

Determinar e descrever passo a passo as etapas de realização do teste de genotipagem "in house" da protease e transcriptase reversa do HIV-1.

2.0 Siglas e Definições:

RNA: Ácido ribonucleico

NB3: Laboratório Nível de Biossegurança 3

DTT: 1,4-Dithiothreitol

DNTP: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

RNA: Ácido ribonucleico

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

dDNTPs: Didesoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DNA: Ácido desoxirribonucleico

HIV-1: Vírus da Imunodeficiência Humana

3.0 Descrição/Procedimento:

Para amostras Clínicas e amostras controles de programa de qualidade (VQAprogram) e AEQ (Ministério da Saúde)

EXTRAÇÃO:

3.1- Este procedimento é para ser realizado na área de **Nível de Biossegurança 3 Área 5 (NB3 pequeno)**.

Procedimentos iniciais:

- Estabilizar a centrífuga a temperatura de 4°C, em todas as etapas será usada na velocidade máxima de 14.000rpm (21.000 – 25.000g).

O RNA viral será obtido a partir do plasma dos indivíduos HIV-1 positivos utilizando o método de extração pelo Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN).

Nota: A extração é iniciada com 500µl de plasma. Centrifugar a 14.000rpm a 4°C por 60 minutos, e remover os tubos da centrífuga assim que o rotor parar.

Cuidadosamente, remover 360µl do sobrenadante, deixando cerca de 140µl de plasma, junto ao pellet, para assegurar a sua integridade.

Obs: Esta etapa pode ser realizada se houver necessidade, ou seja, a amostra apresentar a carga viral abaixo de 1.000 cópias/ml para concentrar o material. Se não houver esta necessidade de concentração do pellet, homogeneizar bem o plasma e iniciar a extração com 140µl de plasma.

A extração pelo método do Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN) é iniciada com a ressuspensão do carrier RNA liofilizado, caso seja a primeira vez de utilização do Kit.

1- Adicionar 310µL do tampão AVE ao frasco contendo o Carrier RNA liofilizado. Homogeneizar por inversão cuidadosamente. Aliquotar 56µL do Carrier RNA ressuspensão em 5 tubos de eppendorf 0,5mL. Armazenar a -20°C e não ultrapassar 3 ciclos de congelamento e descongelamento para cada aliquota.

2- Acrescentar ao tampão AW1 e AW2, somente na primeira utilização do Kit, 25mL e 30mL, respectivamente de Etanol (96-100%) e estocá-los em temperatura ambiente.

3- Preparo do tampão AVL contendo Carrier RNA, em todas as extrações. Em um tubo falcon de 15ml, preparar de acordo com a rotina a ser realizada:

| N° Amostras | Vol. Buffer AVL(ml) | Vol. Carrier RNA-AVE (µl) | N° Amostras | Vol. Buffer AVL(ml) | Vol. Carrier RNA-AVE (µl) |
|-------------|---------------------|---------------------------|-------------|---------------------|---------------------------|
| 1 | 0.56 | 5.6 | 13 | 7.28 | 72.8 |
| 2 | 1.12 | 11.2 | 14 | 7.84 | 78.4 |
| 3 | 1.68 | 16.8 | 15 | 8.40 | 84.0 |
| 4 | 2.24 | 22.4 | 16 | 8.96 | 89.6 |
| 5 | 2.80 | 28.0 | 17 | 9.52 | 95.2 |
| 6 | 3.36 | 33.6 | 18 | 10.08 | 100.8 |
| 7 | 3.92 | 39.2 | 19 | 10.64 | 106.4 |
| 8 | 4.48 | 44.8 | 20 | 11.20 | 112.0 |
| 9 | 5.04 | 50.4 | 21 | 11.76 | 117.6 |
| 10 | 5.60 | 56.0 | 22 | 12.32 | 123.2 |
| 11 | 6.16 | 61.6 | 23 | 12.88 | 128.8 |
| 12 | 6.72 | 67.2 | 24 | 13.44 | 134.4 |

- 4- Pipetar em um tubo de 1,5mL, devidamente identificado, 560µl do tampão AVL/RNA carreador e depois acrescentar ao mesmo tubo, 140µl de plasma (centrifugado durante 60minutos juntamente com o pellet) e posteriormente vortexar de 5 a 10 segundos cada tubo para obter uma mistura homogênea.
- 5- Realizar um spin e depois incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, para remoção de gotículas na parte interna da tampa e evitar contaminação.
- 6- Adicionar 560µl de Etanol (96-100%) à amostra, vortexar 5 a 10segundos e realizar um spin.
- 7- Adicionar 630µl da solução anterior à QIAamp spin column (acoplada a um tubo de 2mL). Realizar uma centrifugação de 8000rpm por 1minuto e após colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2mL, desprezando o tubo contendo o filtrado.
- 8- Repetir o item 7 adicionando todo o volume restante do tubo de 1,5 mL.
- 9- Ainda utilizando a QIAamp spin column e um novo tubo coletor, adicionar 500µl do Tampão AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1minuto. Após, desprezar o tubo de 2mL contendo o filtrado por um novo tubo.
- 10- Adicionar 500µl do Tampão AW2 e centrifugar a 14.000rpm por 3minutos. Após, desprezar o tubo de 2mL contendo o filtrado e substituí-lo por um novo tubo de 1,5mL já identificado para cada amostra.
- 11- Adicionar, sem encostar na coluna, e direcionando a ponteira para o centro da coluna, 40µl de Tampão AVE para eluição. Fechar a tampa e incubar por 1minuto. A pós centrifugar a 8000rpm por 1minuto.
- 12- Não desprezar o tubo coletor de 1,5mL e adicionar mais 40µl de Tampão AVE e incubar por 1minuto. Após, centrifugar a 8000rpm por 1minuto.
- 13- Desprezar a coluna e fechar o tubo contendo o eluido.
- 14- Armazenar o eluido contendo o RNA viral extraído (80µl) a -20 °C por até 72 horas ou a -70 °C por até 1 ano.

OBS: O RNA é muito instável e sensível a degradações. Mantenha-o no gelo em todas as etapas de manipulação. Evite múltiplos descongelamentos.

→ RETRO-TRANSCRIÇÃO:

A reação de retrotranscrição é realizada no NB3.

OBS: manter o material no gelo durante TODO o procedimento!

Em fluxo laminar:

Nomear os tubos de 0,2mL e colocá-los em gelo.

Preparar o mix 1 em um tubo de 0,5mL (fazer sempre um ponto a mais para não faltar material).

| Reagente (Mix1) | 1 reação | 10 reações | 20 reações |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Tampão M-MLV RT 5X | 4 μ l | 40 μ l | 80 μ l |
| Inibidor de RNase (40U/ul) | 1 μ l | 10 μ l | 20 μ l |
| DTT (0,1 M) | 2 μ l | 20 μ l | 40 μ l |
| M-MLV | 1 μ l | 10 μ l | 20 μ l |
| Volume Final | 8μl | 80μl | 160μl |

Em um outro tubo de 0,5mL, preparar o mix 2:

| Reagente (Mix 2) | 1 reação |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Primer Especifico (4pmol) – MMRT6 | 1 μ l |
| DNTP (25mM) | 1 μ l |
| RNA | 10 μ l |
| Volume Final | 12μl |

Aliquotar 2 μ l do mix 2 em cada tubo de 0,2mL identificado anteriormente, e passar os tubos de 0,2mL contendo o mix 2 para a capela de RNA, para ser adicionado 10 μ l do RNA de acordo com a identificação das amostras.

Nota: pingar o RNA na capela.

Aquecer o mix 2 contendo o RNA a 65°C por 5 minutos e colocar imediatamente no gelo, para evitar a formação de estruturas secundárias.

Adicionar 8 μ l do mix 1 nos tubos. Homogeneizar e prosseguir para a ciclagem a baixo:

| Temperatura (°C) | Tempo (min) |
|------------------|---------------|
| 37°C | 90minutos |
| 70°C | 15minutos |
| 4°C | Indeterminado |

Armazenar o cDNA a -20°C.

Nota: O primeiro round do PCR pode ser realizado no NB3. Adicionar o cDNA aos tubos contendo o mix de PCR (na capela) e selecionar no termociclador no programa utilizado.

→ REAÇÃO DE PCR "nested":

Primeiro preparar os mixes de PCR 1 e 2 em uma capela ou fluxo laminar livre de amplicon (localizado no NB1) conforme tabelas abaixo:

Nota: A reação de PCR 1º round pode ser realizada no NB3. Manter o material no gelo durante TODO o procedimento!

| Mix (PCR 1º Round) | 1 reação | 8 reações |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 10X Taq Buffer | 5 μ l | 40 μ l |
| MgCl ₂ (50mM) | 2,5 μ l | 20 μ l |
| dNTP (25mM) | 0,6 μ l | 4,8 μ l |
| Primers 1 (PCR 1) | 0,7 μ l | 5,6 μ l |
| Primers 2 (PCR 1) | 0,7 μ l | 5,6 μ l |
| H ₂ O DEPC | 35,5 μ l | 284 μ l |
| Volume Final | 45μl | 360μl |

| Mix (PCR 2º Round) | 1 reação | 8 reações |
|--------------------------|-------------|--------------|
| 10X Taq Buffer | 5µl | 40µl |
| MgCl ₂ (50mM) | 2,5µl | 20µl |
| dNTP (25mM) | 0,6µl | 4,8µl |
| Primers 1 (PCR 2) | 0,7µl | 5,6µl |
| Primers 2 (PCR 2) | 0,7µl | 5,6µl |
| H ₂ O DEPC | 35,5µl | 284µl |
| Volume Final | 45µl | 360µl |

Jogo de primers utilizados no PCR longo e no Resgate (Fragmentos 1 e 2):

| | PCR Longo 1 | PCR Longo 2 | PCR Resgate | |
|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| | | | Fragmento 1 | Fragmento 2 |
| PCR 1º Round | DP10 – MMRT6 | G17S – MMRT6 | G17S – RT12 | POL3 – MMRT6 |
| PCR 2º Round | DP16 – MMRT5 | MMRT10 – MMRT5 | MMRT10 – RT4 | POL4 – MMRT5 |

1) Preparo da reação de PCR 1: identificar de acordo com a quantidade de amostras que deseja amplificar tubos de 0,2ml, em um tubo de 0,5ml preparar um outro mix, contendo: 45µl do mix PCR 1 e 0,3ml de Taq Platinum por amostra, ainda na área limpa, e aliquotar 45µl deste mix (mix PCR 1 + Taq) nos tubos de 0,2ml identificados. Proceder da mesma forma para o preparo da reação de PCR 2 (somente mix PCR 2 + Taq) e guardá-lo no freezer até o uso na sala de Biologia Molecular (BM).

2) Após este preparo, em uma outra capela de DNA (localizado na sala NB3pequeno) adicionar 5µl de cDNA em seu respectivo tubo previamente identificado.

3) Quando todos os tubos de 0,2ml estiverem contendo o mix de PCR1 + Taq + DNA a ser amplificado, colocá-los no termociclador utilizando o programa Platinum para a realização do 1º round de PCR.

| Nº de ciclos | Temperatura °C | Tempo |
|--------------|----------------|---------------|
| 1 | 94 | 2 minutos |
| 35 | 94 | 30 segundos |
| | 55 | 30 segundos |
| | 72 | 2 minutos |
| 1 | 72 | 10 minutos |
| | 4 | indeterminado |

4) Após o término da reação de PCR do 1º round, levar todos os tubos do 1º (mix PCR 1 + Taq + DNA, já amplificado) e 2º round (mix PCR 2 + Taq, para amplificar) para a Sala da Biologia Molecular (BM) e pegar 5µl do mix do 1º round (fora da capela) para o 2º round (dentro da capela), fechar todos os tubos ainda dentro da capela e colocá-los no termociclador para a realização do 2º round da reação de PCR, com o mesmo programa anteriormente descrito.

5) Após o término da reação de PCR 2º round, visualizar a amplificação em gel de agarose 1%.

→ VISUALIZAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO:

- 1) Preparar um gel de agarose 1% em tampão TBE 1X.
- 2) Preencher a cuba de eletroforese com tampão TBE 1X.
- 3) Misturar 2µl do DNA purificado com 2µl de tampão de corrida (carregador) e 3µl de GelRed.
- 4) Aplicar 2µl do ΦX174 no primeiro canal do gel.
- 5) Aplicar as amostras e os controles a partir do segundo canal do gel.

- 6) Correr numa voltagem de 100-150V até que o corante migre cerca de 2cm (35 a 40 minutos).
- 7) Analisar o gel na luz Ultravioleta (UV).
- 8) Fotografar o gel utilizando um tempo de exposição que não sature o filme e que mostre as diferenças de intensidade entre os fragmentos dos marcadores de peso molecular.

→ **PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS:**

Utilizando o kit GE, separar e identificar os tubos de 0,5 (armazenar o DNA); 1,5 (cortar as tampas) e os tubos coletores com as colunas de purificação.

Adicionar 250µl do tampão de captura nas colunas de purificação.

Adicionar 50µl do DNA (produto do PCR) e homogeneizar aproximadamente 10 vezes.

Centrifugar na velocidade máxima por 1 minuto.

Descartar o conteúdo do tubo coletor e não jogá-lo fora. Colocar novamente a coluna de purificação no tubo.

Adicionar 250µl do tampão de lavagem nas colunas de purificação.

Centrifugar na velocidade máxima por 1 minuto.

Descartar o tubo coletor e colocar as colunas de purificação nos tubos de 1,5ml.

Adicionar 50µl do tampão de eluição (ou água bidestilada autoclavada) nas colunas de purificação. (Se quiser mais concentrado ressuspender em volume menor).

Descansar por 1 minuto e centrifugar na velocidade máxima por 1 minuto para eluição completa do DNA purificado.

Transferir o DNA para os tubos de 0,5ml.

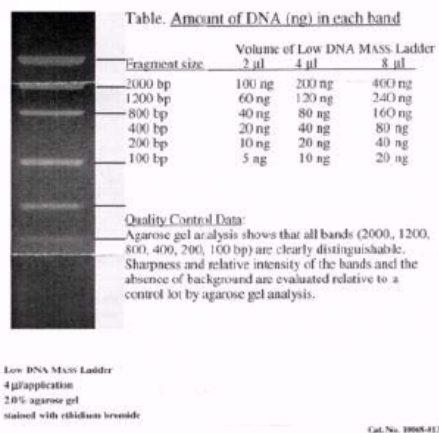
Guardar no congelador até o uso na reação de sequenciamento.

→ **QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS:**

A validação do procedimento de purificação é feita através de eletroforese em gel de agarose 1% para verificação dos produtos purificados utilizando o padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder (para fragmentos menores de 2000pb). Seguindo os mesmos passos da etapa de visualização de amplificação. Tempo de corrida: 35 a 40 minutos.

Low DNA Mass Ladder:

OBS: Para produtos maiores do que 2000bp utilizar High DNA Mass Ladder.



| Fragmento | Volume de Low DNA Mass Ladder | | |
|-----------|-------------------------------|--------|--------|
| | 2 µl | 4 µl | 8 µl |
| 2000pb | 100 ng | 200 ng | 400 ng |
| 1200pb | 60 ng | 120 ng | 240 ng |
| 800pb | 40 ng | 80 ng | 160 ng |
| 400pb | 20 ng | 40 ng | 80 ng |
| 200pb | 10 ng | 20 ng | 40 ng |
| 100pb | 5 ng | 10 ng | 20 ng |

→ REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO:

O kit Big Dye Terminator já vem com dNTPs e polimerase (assim como em uma reação de PCR) e também os dNTPs, que são marcados com fluorocromos. Esses dNTPs não têm a extremidade 3'OH, logo quando são inseridos na sequência sintetizada, finalizam essa sequência. Os dNTPs estão em uma concentração na qual, probabilisticamente, são capazes de sequenciar todo o fragmento analisado.

- Separar a placa de sequenciamento (96 poços), ou tubos de 0,2ml identificados.
- Separar as pipetas de 10µl e 20µl ; e ponteiros de 10µl e 20µl .
- Anotar em uma planilha a ordem das amostras a serem sequenciadas juntamente com os primers desejados. Não se esquecendo de identificar a planilha e a placa com nome e data da reação de sequenciamento.
- Para cada amostra a ser sequenciada:
 - Adicionar aos poços ou tubos 1µl do Big Dye Terminator, que deve estar em um frasco protegido da luz (recoberto por papel alumínio) e ser adicionado primeiramente para evitar contaminação;
 - 1,5µl do Tampão Big Dye,
 - 1µl do primer na concentração de 5pmol (diferente do PCR, que usamos a 25pmol). Para reação de sequenciamento dos genes da POLIMERASE (PROTEASE e TRANSCRIPATSE REVERSA), utilizamos no sequenciamento do PCR Longo os primers: DP11, DP16, LR49, LR54, TCTPol, POL4, SEQRT, HIP202 e MMRTR5. Para o sequenciamento do resgate no fragmento 1 é utilizado os primers (Pol, DP16, RT9, RT4, LR50, MMRT10, SEQRT), e para o fragmento 2 os primers (Pol4, LR54F, TCTPol, MMRT5, SEQRT).
 - A quantidade do produto purificado depende da quantificação do DNA. Utilizar 1,5µl para aquelas amostras que apresentaram de 60 a 100ng. Para as amostras que apresentaram entre 40 e 60ng, adicionar 2,5µl; e as amostras que apresentarem entre 20 e 40ng, adicionar aproximadamente 3,5µl na reação de sequenciamento.

A validação da reação de sequenciamento será através da edição manual das sequências utilizando o programa SeqMan (DNASTAR), podemos verificar a qualidade das sequências geradas através de parâmetros como: tamanho da sequência, pureza (quando não há sobreposição de picos), amplitude do pico, capacidade de formar contigs correspondendo a todo o fragmento sequenciado, verificação se o fragmento gerado é o esperado através do uso da ferramenta HIV Locator tool, disponível no site <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html>.

→ PRECIPITAÇÃO ALCÓOLICA:

- 1- Preparar uma solução de isopropanol 75% para amostras utilizadas na versão 3.1 do Big Dye.
- 2- Adicionar 80µl de isopropanol 75% ao produto de sequenciamento.
- 3- Incubar a temperatura ambiente por 15minutos para que ocorra a precipitação.
- 4- Centrifugar por 45minutos na velocidade máxima da centrífuga (para tubo 14000rpm ou para placa 4000rpm).
- 5- Retirar o sobrenadante sem tocar no pellet, invertendo o tubo ou a placa em papel absorvente.
- 6- Centrifugar a placa ainda invertida em papel absorvente por 1minuto a 900rpm.

POP LABAIDS-017P Genotipagem Protocolo "in house"

7- Deixar os tubos abertos ou colocá-los a 75°C por 5 minutos no termociclador para evaporar todo o isopropanol. Congelar o pellet, envolvendo os tubos em papel alumínio, caso não for prosseguir com o sequenciamento. Este pellet é estável por cerca de 1 semana. Uma vez ressuspenso em formamida Hi-Di, a reação é estável por 48 horas, à temperatura ambiente e cinco dias na geladeira, envolta em papel alumínio.

→ RESSUSPENSÃO:

1. Ressuspende o pellet entre 10µl a 20µl de formamida Hi-Di.
2. Desnaturar as amostras a 95°C por 5 minutos no termociclador e colocá-las imediatamente no gelo por no mínimo 1 minuto.

4.0 Não Conformidade / Ação Corretiva:

- 4.1) Qualquer procedimento realizado de forma distinta ao descrito neste POP será considerado "não conformidade".
- 4.2) Ação corretiva: documentação da não conformidade em caderno de protocolos.

5.0 Manutenção e validação

A validação deste ensaio ocorrerá nas etapas seguintes através das análises das sequências obtidas na reação de sequenciamento.

Valores de referência mínimo: 1000cópias/ml.

6.0 Descrição da modificação

Não houve modificação nesta versão do POP. **Apenas novo formato.**

7.0 Anexos

PROTOCOLO DE GENOTIPAGEM “In House”

Data da Extração Kit Qiagen: _____ Nº lote do kit: _____
Operador: _____ Exp.: _____

| ID da Amostra | Data da Coleta | Carga Viral |
|---------------|----------------|-------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Nº do Lote: _____ Exp: _____

Data do preparo do mix de PCR I e II Round: _____

Data da RT: _____

| Mix 1 - RT | Vol. p/01 Amostra | Vol. Amostras |
|-----------------|-------------------|---------------|
| TP M-MLV 5X | 4µl | |
| RNAase Inibidor | 1µl | |
| M-MLV | 1µl | |
| DTT 0.1M | 2µl | |
| Volume Final | 8µl | |

Data da PCR I: _____

| | Vol. p/ 01 Amostra | Vol. Amostras |
|--------------|--------------------|---------------|
| MIX PCR I | 45µl | |
| Amostra | 0,3µl | |
| Volume Final | 50µl | |

Overnight: () Sim () Não

| Mix 2 - RT | Vol. p/01 Amostra | Vol. Amostras |
|---------------------------------|-------------------|---------------|
| Primer Especifico MMRT6 (4pmol) | 1µl | |
| dNTP 25mM | 1µl | |
| RNA | 10µl | |
| Volume Final | 12µl | |

Data da PCR II: _____

| | Vol. p/ 01 Amostra | Vol. Amostras |
|--------------|--------------------|---------------|
| MIX PCR II | 45µl | |
| Amostra | 0,3µl | |
| Volume Final | 50µl | |

Overnight: () Sim () Não

Gel de Agarose 1% para visualização de Amplificação Data: _____

Purificação Data: _____

Kit de purificação:

Lote: _____

Exp: _____

Quantificação Data: _____

| | | | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Poço: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| ID.: | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ |
| Quant.(ng): | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ |
| Poço: | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| ID.: | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ |
| Quant.(ng): | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ |

Data da Reação de Sequenciamento: _____

Overnight: () Sim () Não

| Reação de Sequenciamento | Vol. p/01 Amostra | Vol. Amostras |
|--------------------------|-------------------|---------------|
| Big Dye | 1µl | |
| TP 5X Big Dye | 1,5µl | |
| Primer | 1µl | |
| Amostra | | |
| H ₂ O | | |
| Volume Final | 10µl | |

Primers Utilizados p/ Amostra:

| | | | |
|--|---------|--|----------|
| | DP16 → | | Pol03 → |
| | DP11 ← | | Pol04 → |
| | LR49 → | | RT9 → |
| | LR51 ← | | DP17 ← |
| | LR54 ← | | RT1 → |
| | SEQRT → | | LR50 → |
| | RT4 ← | | RT12 ← |
| | Pol01 → | | H1P202 ← |

Data do Sequenciamento: _____

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Data da Análise/ Edição: _____

Data da Montagem do Sequenciador: _____

Observações:

Os controles de qualidade encontram-se de acordo com o esperado? () Sim () Não
 Ensaio liberado? () Sim () Não

Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/FIOCRUZ Registro de Ocorrência e Ação Corretiva

| Data | Problema ou Descrição da Ocorrência | Rubrica | Descrição da Ação Corretiva ou Reparo Realizado | Rubrica | Data |
|------|-------------------------------------|---------|---|---------|------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Revisão do Supervisor/Comentários: _____

Assinatura do Supervisor: _____

Data: _____

ANEXO B – PORTARIA Nº 29, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2013.

Aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças e dá outras providências.

O SECRETÁRIO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, no uso das atribuições que lhe confere o art. 55, do Anexo ao Decreto nº. 8.065, de 7 de agosto de 2013, e

Considerando a necessidade de se criar alternativas para a ampliação do acesso ao diagnóstico da infecção pelo HIV, em atendimento aos princípios da equidade e da integralidade da assistência, bem como da universalidade de acesso aos serviços de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS);

Considerando que a identificação dos indivíduos infectados pelo HIV é importante porque permite o tratamento, o acompanhamento precoce nos serviços de saúde e a melhora na qualidade de vida;

Considerando que a definição do estado sorológico de um indivíduo infectado pelo HIV é fundamental para sua proteção, controle da infecção e da disseminação do vírus;

Considerando que não existem testes laboratoriais que apresentem 100% (cem por cento) de sensibilidade e de especificidade, e que resultados falso-negativos, falso-positivos, indeterminados ou discrepantes podem ocorrer na prática diária entre os distintos testes;

Considerando que existem vários fluxogramas estabelecidos de acordo com o avanço científico e com a experiência mundial consolidada, que permitem o diagnóstico correto da infecção pelo HIV, por meio da combinação dos diferentes testes disponíveis no mercado; e

Considerando que para o diagnóstico da infecção pelo HIV faz-se necessária a avaliação conjunta da história clínica e do risco de exposição do indivíduo à infecção concomitantemente ao resultado laboratorial, que irá orientar as decisões e a conclusão diagnóstica. E ainda, que a ocorrência de resultados indeterminados ou falso positivos é maior particularmente em gestantes e/ou portadores de algumas enfermidades autoimunes, resolve:

Art. 1º Aprovar o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças, disponível no endereço eletrônico www.aids.gov.br, que contém os fluxogramas recomendados para diferentes cenários e situações que se adequem à pluralidade de condições e à diversidade de serviços de saúde públicos e privados.

Parágrafo único. O Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças será revisto semestralmente e atualizado à luz dos avanços científicos por um comitê composto por profissionais de notório saber.

Art. 2º Fica definido que as amostras podem ser de soro, plasma, sangue total, sangue seco em papel filtro, fluido oral ou de outros fluidos que tenham eficácia

diagnóstica cientificamente comprovada. § 1º Todas as amostras devem ser coletadas e testadas em conformidade com o que é preconizado pelo fabricante do conjunto diagnóstico a ser utilizado.

§ 2º É vedada a mistura de amostras (pool) para a utilização em qualquer teste laboratorial que tenha o objetivo de diagnosticar a infecção pelo HIV.

Art. 3º Todos os produtos para diagnóstico de uso in vitro, reagentes e insumos utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HIV devem possuir registros vigentes na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com o disposto na Resolução RDC nº 302/ANVISA, de 13 de outubro de 2005, suas alterações, ou outro instrumento legal que venha a substituí-la.

Art. 4º Deve ser exigida a apresentação de um documento oficial do indivíduo submetido à coleta de amostra, que deverá ser conferido, tanto no momento do registro no serviço de saúde, quanto no momento da coleta da amostra.

Parágrafo único. Fica assegurada a testagem anônima, entretanto o indivíduo deverá ser informado no momento da coleta que não será fornecido resultado por escrito.

Art. 5º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 6º Fica revogada a Portaria/SVS/MS nº 151, de 14 de outubro de 2009, publicada no Diário Oficial da União nº. 198, de 16 de outubro de 2009, Seção 1, págs. 4044.

JARBAS BARBOSA DA SILVA JÚNIOR

ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
 Volume 31, Number 00, 2015
 © Mary Ann Liebert, Inc.
 DOI: 10.1089/aid.2015.0280

HIV-1 Genetic Diversity and Transmitted Drug Resistance in Antiretroviral Treatment-Naive Individuals from Amapá State, Northern Brazil

Lindomar dos Anjos Silva,¹ Flavia Divino,² Márlisson Octávio da Silva Rêgo,¹ Ivina Geselle Lima Lopes,¹ Cláudia Maria Nóbrega Costa,¹ Francis Christian da Silva Pereira,¹ Ivano de Filippis,³ and Gonzalo Bello²

Abstract

The pattern of HIV-1 subtype distribution and prevalence of transmitted drug resistance mutations (TDRM) is heterogeneous across different Brazilian regions. Little information is available about the molecular epidemiologic profile in Northern Brazil. HIV-1 protease (PR) and reverse transcriptase (RT) sequences were obtained from 97 drug-naive HIV-1-infected individuals from Amapá, one of the most isolated Northern Brazilian states, for subtype determination and analysis of drug resistance mutations. The most prevalent HIV-1 clade observed in Amapá was subtype B (74%), followed by subtype F1 (14%), BF1 recombinants (8%), subtype C (1%), CRF31_BC (1%), and CRF02_AG (1%). Only one TDRM (K103N) was detected in a single patient from our study population. This study reveals that the HIV-1 epidemic in Amapá is characterized by a high level of genetic diversity comparable to that observed in major Brazilian cities, but a much lower rate of TDRM (1%).

ACCORDING TO ESTIMATIONS by the Brazilian Ministry of Health, about 700,000 people were living with HIV and approximately 300,000 HIV-infected individuals were on antiretroviral therapy (ART) in Brazil in 2013.¹ The AIDS Brazilian epidemic is mostly driven by HIV-1 subtypes B, F1, C, and recombinant forms among those subtypes.^{1–5} Whereas the HIV-1 subtype distribution profile has remained relatively stable over time in Brazil, the widespread use of ART in the country since 1996 has led to a substantial increase in the emergence and transmission of HIV strains harboring resistance mutations to one or more antiretroviral agents. According to national-wide studies that characterized HIV-infected treatment-naive individuals from different Brazilian regions, the overall rate of transmitted drug resistance mutations (TDRM) increased from 6.6% to 12.2% over the past 10–15 years.^{2–5}

The relative prevalence of different HIV-1 subtypes and TDRM could greatly vary across different Brazilian regions^{2–5} and molecular epidemiological data in some areas away from the most populated urban centers are scarce. Amapá is one of the northernmost Brazilian states, bordered by French Guiana and Suriname to the north, the Atlantic Ocean to the east, and the Pará state to the south and west.

Amapá is the second least populous Brazilian state with 734,995 inhabitants. The Amazon Rainforest occupies 90% of the total area of Amapá and its population is highly urbanized, being mostly (75%) concentrated in Macapá (state capital) and the neighboring city of Santana. By 2013, about 1,347 AIDS cases had been cumulatively reported in Amapá since the first identification of AIDS in the state in 1988.¹ The incidence rate of AIDS cases in Amapá has doubled between 2001 (9.2/100,000 inhabitants) and 2012 (20.2/100,000 inhabitants), and is currently similar to the mean incidence rate observed in the North region (21.0/100,000 inhabitants) and in Brazil (20.2/100,000 inhabitants).¹

There is almost no information about the molecular epidemiological profile of the HIV epidemic in Amapá. The only study performed to date analyzed very short fragments (<300 nucleotides) of the envelope and/or protease genes from a small number of patients ($n \leq 35$) with no information about treatment status.⁶ The objective of this study was to perform a comprehensive description of the HIV-1 subtypes and rate of TDRM detected among ART-naive patients from different regions of Amapá.

A total of 97 peripheral blood samples from HIV-1-infected persons living in different cities through the Amapá

¹Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP), Macapá, Brazil.

²Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

³Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

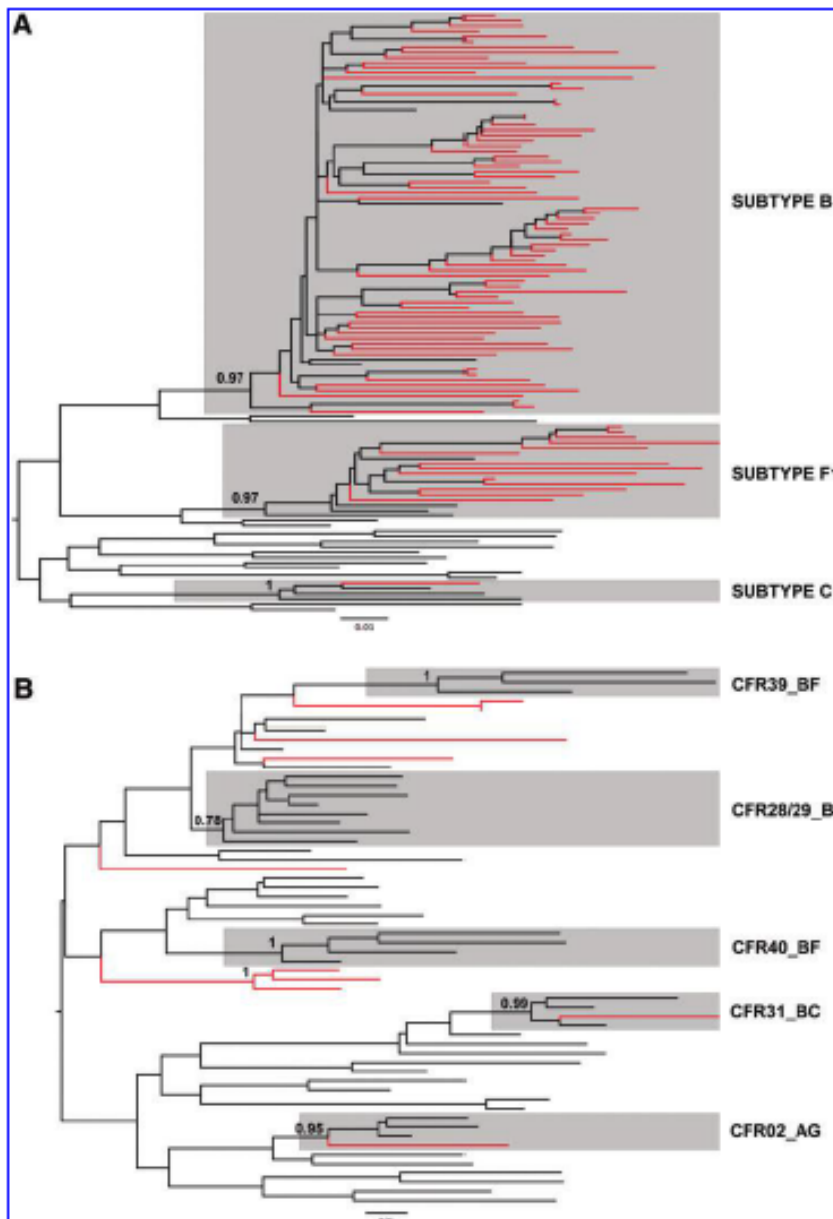


FIG. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree of the *pol* region of HIV-1 isolates obtained from antiretroviral drug-naïve patients from Amapá state. **(A)** HIV-1 sequences from Amapá classified as “pure” subtypes were combined with reference sequences of all HIV-1 group M subtypes (A–D, F–H, I, and K). *Shaded boxes* indicate the position of major HIV-1 subtypes circulating in Brazil. **(B)** HIV-1 sequences from Amapá classified as intersubtype recombinants (BF, BC, and AG) were combined with reference sequences of all HIV-1 group M subtypes, the CRF02_AG, and Brazilian CRF_BF (28, 29, 39, and 40) and CRF_BC (31) with recombination points at the *pol* gene fragment analyzed. *Shaded boxes* indicate the position of major Brazilian CRFs and the CRF02_AG clade. Sequences from Amapá are represented as *red branches*. The aLRT branch support was shown only at key nodes. Trees are rooted at midpoint and the branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site. Color images available online at www.liebertpub.com/aid

state were collected between 2013 and 2014. Patients attended the Public Health Central Laboratory (LACEN) in Macapá/Amapá, a reference unit from the Brazilian Ministry of Health that receives samples for monitoring of CD4⁺T cell count and plasma viral load. Inclusion criteria were patients with a recent or chronic diagnosis of HIV-1 infection of either sex, of any age range, and who never received ART.

Blood samples were stored at -70°C and later transported to the Laboratory of AIDS and Molecular Immunology (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro for HIV subtype and resistance analyses. The study was approved by the Ethics Committee

of Instituto Oswaldo Cruz (Number CAAE: 35785214.5.1001.5248).

DNA was extracted from 200 μl of total blood and an HIV-1 *pol* fragment of about 1,100 nucleotides encompassing the entire protease (PR) and part of the reverse transcriptase (RT) (nucleotides 2253–3272 relative to the HXB2 clone) and was amplified and sequenced as previously described.⁷ HIV-1 genetic subtypes were initially determined with the REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0 software⁸ and later confirmed by maximum-likelihood (ML) phylogenetic and bootscan analyses with HIV-1 reference sequences from the Los Alamos

HIV database (www.hiv.lanl.gov). ML trees were reconstructed with the PhyML 3.0 program,⁹ using the SPR branch-swapping algorithm for heuristic tree search and the approximate likelihood-ratio test (aLRT) to estimate the reliability of the obtained tree topology. Bootscan analyses were performed with SimPlot 3.5.1 software,¹⁰ based on 100 resamplings with a sliding window of 250 nucleotides moving in steps of 10 bases. TDRM to the nucleoside/nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI/NNRTI) and protease inhibitors (PI) were analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool available through the Stanford University HIV Drug Resistance Database (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>).¹¹

Around one-third (76/97) of the HIV-infected patients analyzed in this study lived in the city of Macapá (state capital) and the neighboring city of Santana, whereas the remaining patients (21/97) came from eight different small interior cities located throughout the state. Nine of the 10 most populated cities of the Amapá state were represented in our sample. Most patients analyzed were males (64%) and had a median age of 33 years (15–72 years range), with similar values for both males (31 years, 15–72 years range) and females (34 years, 17–56 years range). The median of CD4 T cell counts for our study population was 370 cells/ μ l and was distributed as follows: 35% below 200 cells/ μ l, 31% between 201 and 500 cells/ μ l, and 34% over 500 cells/ μ l. The median RNA plasma viral load was 12,138 copies/ml distributed in the following way: 15% below 1,000 copies/ml, 31% between 1,000 and 10,000 copies/ml, 29% between 10,001 and 100,000 copies/ml, and 25% over 100,000 copies/ml.

The most prevalent HIV-1 clade in our sample was subtype B ($n=72$, 74%), followed by subtype F1 ($n=14$, 14%) and subtype C ($n=1$, 1%) (Fig. 1A). The remaining viruses ($n=10$, 10%) were classified as intersubtype recombinant clades. Most recombinant viruses ($n=8$, 8%) displayed a BF1 recombinant structure and were distributed in five independent lineages of between one and three sequences each, none of which branched with the BF1 circulating recombinant forms (CRFs_{BF}) previously described in Brazil (Fig. 1B). We also identified one BC recombinant (1%) and one AG recombinant (1%) that were classified as CRF31_BC and CRF02_AG by REGA analysis. Consistent with this classification, the BC and AG recombinants branched with high support with the CRF31_BC and CRF02_AG reference strains, respectively (Fig. 1B). HIV-1 clades B, F1, and BF1 were detected in the major cities (Macapá and Santana) as well as in the small interior ones. The subtype C and the CRF02_AG-like variants were detected in the capital city Macapá, whereas the CRF31_BC-like strain was detected at the northernmost Brazilian city, Oiapoque, located in the border with French Guiana.

The viral diversity here detected in Amapá is much higher than that previously reported for this state by Machado *et al.* (2009), which described only the circulation of subtypes B (97%) and F1 (3%) in a population of HIV-infected patients recruited in 2002. Such inconsistent observations among studies may have resulted from differences in the population size and HIV-1 gene fragments analyzed or may reflect an increasing trend of HIV-1 diversity in Amapá over time. The HIV-1 molecular diversity in Amapá is comparable to that found in many major Brazilian metropolitan centers in which

the epidemic is dominated by subtype B, F1, and BF1 recombinants.^{2–5} This study also confirms the circulation in the northernmost Brazilian region of HIV-1 subtype C and CRF31_BC that prevails in the southernmost Brazilian states,^{2–4} and of the CRF02_AG that is highly prevalent in West and Central Africa, but was rarely detected in Brazil. The HIV-1 complexity detected is consistent with multiple independent introductions of HIV-1 strains into Amapá from other Brazilian states and probably other countries.

Notably, only one TDRM to NNRTI (K103N) was detected in a single patient, whereas no TDRM to NRTI or PI were detected in the study population. Two out of 97 HIV-1 *pol* sequences analyzed were excluded due to the presence of >2 APOBEC3GF-mediated G to A mutations. The extremely low levels of TDRM (1%) observed in Amapá clearly contrast with the most recent surveys that showed an intermediate level (5–20%) of TDRM in cities of medium and large size from the Southeast (Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo), North (Pará and Tocantins), Northeast (Recife and Piauí), and Central-West (Brasília, Goiânia, and Mato Grosso) Brazilian states.^{3–5,12–15} The low rate of TDRM observed in Amapá might be associated with a low frequency of virological failure among treated patients, or may reflect a low access to ART or a later introduction of ART in areas located far from the major Brazilian urban centers.

In conclusion, the results from this study support the development of a complex HIV-1 molecular pattern in Amapá, one of the northernmost Brazil states, characterized by the cocirculation of subtypes B, F1, C and diverse recombinant forms, including subtypes B/F1, B/C, and A/G. Despite the relative small size of the HIV-infected population, the low spatial connectivity with other Brazilian states, and the great distance to the major epicenters of the epidemic, the overall genetic complexity of the HIV-1 epidemic in Amapá is comparable to that described in major Brazilian cities. The HIV epidemic in Amapá is also characterized by one of the lowest rates of TDRM (1%) described to date in the country, which does not support recommendations for pretreatment genotypic tests in naive patients. This study reinforces the importance of continuous monitoring of HIV-1 subtypes and transmission of drug-resistant strains in different Brazilian regions in order to obtain a clearer picture of the spatial heterogeneity of the HIV epidemic in this huge country.

Sequence Data

Sequences were deposited in GenBank under accession numbers KT737274 to KT737370.

Acknowledgments

F.D. was funded by a fellowship from Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. The authors are grateful to the “Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA, RPT01A, PDTIS/FIOCRUZ.”

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Brazilian Ministry of Health. *AIDS Epidemiological Bulletin* [in Portuguese]. January–June 2013; Ano II, no. 01.

- Available from www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/p_boletim_2013_internet_pdf_p_51315.pdf.
2. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, *et al.*: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): A survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;17(7):1063–1069.
 3. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, *et al.*: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: A survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 2009;12:20.
 4. Sprinz E, Netto EM, Patelli M, *et al.*: Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25(9):861–867.
 5. 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.
 6. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, *et al.*: Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: Identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25(10):961–966.
 7. Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, *et al.*: Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 2008;22(15):1993–2000.
 8. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, *et al.*: An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005;21(19):3797–3800.
 9. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, *et al.*: New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 2010;59(3):307–321.
 10. Ray S: SimPlot v2.5.0. Available from www.med.jhu.edu/deptmed/sray/download/.
 11. Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, *et al.*: The calibrated population resistance tool: Standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 2009;25(9):1197–1198.
 12. Cardoso LP, Queiroz BB, and Stefani MM: HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 2009;46(2):134–139.
 13. Carvalho BC, Cardoso LP, Damasceno S, and Stefani MM: Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland North State of Tocantins, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(10):1081–1087.
 14. Ferreira AS, Cardoso LP, and Stefani MM: Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol* 2011;83(8):1301–1307.
 15. Moura ME, da Guarda Reis MN, Lima YA, *et al.*: HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. *J Med Virol* 2015;87(5):798–806.

Address correspondence to:

Gonzalo Bello

Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular

Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ

Av. Brasil 4365

21045-900 Rio de Janeiro, RJ

Brazil

E-mail: gbello@ioc.fiocruz.br

gbellobr@gmail.com