

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS NO CENTRO DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DE FORTALEZA

Colares, J.K.B.; Mello, L.M.S.; Guimarães, A.L.O.; Barbosa, J.R.;
Silva, S.S.; Silva-Santiago, S.C.; Lopes, G.I.S.L.; Lima, D.M.;
Brígido, L.F.M.; Jeová Keny Baima Colares¹

Resumo

A terapia antirretroviral proporcionou melhora importante na sobrevivência e qualidade de vida das pessoas com HIV/AIDS. Seu objetivo é suprimir a replicação viral, evitando o dano ao sistema imune e o surgimento de mutações no vírus HIV-1. Paradoxalmente, o tratamento irregular pode favorecer a seleção de variantes resistentes, representando uma das principais causas de falha terapêutica. Tais cepas resistentes podem ser transmitidas a outros indivíduos (resistência transmitida), predispondo à falha precoce do tratamento inaugural. Os testes de resistência, principalmente a genotipagem, permitem a detecção de mutações do genoma viral. O objetivo deste estudo foi caracterizar as mutações de resistência transmitida do HIV-1 aos antirretrovirais em pacientes recém-diagnosticados no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) de Fortaleza. Durante o período de outubro de 2013 a setembro de 2014, foram recrutados pacientes com sorologia reagente para o HIV, realizado no CTA. Foram colhidas amostras para a realização de quantificação da carga viral (Abbott RealTime), contagem de linfócitos CD4⁺ (FACSCalibur BD) e genotipagem HIV-1 (TruGene Siemens). As sequências genéticas foram alinhadas pelo programa MEGA e BioEdit. Os subtipos do vírus HIV-1 foram determinados e identificados empregando análises no banco de dados do REGA HIV Subtyping Tool. A análise das mutações de resistência aos antirretrovirais foi realizada utilizando o algoritmo da Universidade de Stanford (HIVdb Program) e as mutações de resistência transmitida foram identificadas empregando a Calibração de Resistência Populacional (CPR). Durante o estudo foram obtidas amostras biológicas de 108 pacientes, sendo que em 105 delas foi possível realizar a reação de sequenciamento e a avaliação quanto à presença de mutações de resistência associadas aos antirretrovirais. A prevalência global de resistência transmitida encontrada neste estudo foi de 9,5% (N=10), sendo 2,9% aos análogos de nucleosídeos, 5,7% aos não-análogos, 1,9% aos inibidores da protease. A mutação mais prevalente foi a K103N (25%). A identificação de subtipos foi realizada em 105 amostras, tendo sido mais prevalente o subtipo B (86,7%), seguido do F1 (3,8%) e C (2,8%), além de formas recombinantes (5,7%). Foi detectado pela primeira vez no Ceará o CRF02_AG

(1,9%). Foram encontrados 3,8% de recombinantes BF nos genes da PR e TR, sendo subtipo F na protease e subtipo B na transcriptase reversa e um desses foi classificado como

¹ Coordenador do projeto, Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7791998940815454>, Maior titulação: Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas - Universidade de Fortaleza.

CRF12_BF. A vigilância da prevalência das mutações de resistência transmitida e a caracterização da diversidade genética da epidemia na população da região são fundamentais para a definição de políticas públicas de saúde.

Palavras-chave: HIV-1/transmissão; Terapia Antirretroviral de Alta Atividade; Farmacorresistência Viral; variação genética.

Introdução

A pandemia do HIV se estabeleceu há cerca de 30 anos, tornando-se um dos maiores desafios enfrentados na história da saúde pública em âmbito global. Estima-se que neste período cerca de 78 milhões de pessoas foram infectadas, sendo causados 39 milhões de óbitos. Atualmente, cerca de 35 milhões de pessoas vivem com HIV/Aids em todo o mundo. Na última década foram obtidos importantes avanços, que têm sido relacionados aos esforços de oferecer de forma cada vez mais ampla os recursos de prevenção e tratamento desta doença, especialmente o acesso à terapia antirretroviral de alta potência. Como consequência, tem sido observada queda de 38% na detecção de novos casos desde 2001 e 35% do número de óbitos desde 2005.¹

A epidemia brasileira apresenta características peculiares, estando historicamente concentrada principalmente na região Sudeste e envolvendo desproporcionalmente algumas populações mais vulneráveis. O Ministério da Saúde brasileiro estimava que ao final do ano de 2013 existiam 734 mil brasileiros infectados pelo HIV, sendo que destes apenas 80% já haviam sido diagnosticados. A evolução histórica das taxas de detecção e de óbitos apresentam comportamento de estabilidade na última década, embora existam importantes diferenças entre as regiões do país, com queda acentuada do número de casos e de óbitos, especialmente na região Sudeste, enquanto nas regiões Norte e Nordeste ainda é observado o aumento destes indicadores.² Tais discrepâncias nos apontam a necessidade do estudo mais aprofundado da realidade epidemiológica em tais regiões, buscando compreender as suas peculiaridades e traçar novas abordagens que possibilitem o controle da epidemia.

O uso de antirretrovirais tem se demonstrado ferramenta extremamente valiosa, tanto para evitar a instalação da doença e o óbito em indivíduos infectados,³ quanto na redução significativa da transmissibilidade.⁴ Os maiores limitantes ao controle da pandemia do HIV parecem ser o diagnóstico tardio, o acesso aos antirretrovirais, a baixa vinculação e retenção dos indivíduos aos serviços e a baixa adesão ao tratamento, além da variabilidade genética viral, que pode resultar em resistência viral e falência do

esquema terapêutico. O Brasil oferece acesso universal aos antirretrovirais desde 1996, com a lei 9113/96.⁵ Entretanto, os resultados obtidos estão aquém do esperado.

Em dezembro de 2013 o Brasil adotou mais uma corajosa medida no enfrentamento da epidemia do HIV/Aids, passando a recomendar o início imediato da terapia antirretroviral a todos os indivíduos infectados pelo HIV, independente da contagem de linfócitos CD4+.⁶ O racional para tal recomendação se baseia em evidências de acentuada redução na transmissibilidade viral, resultante da redução da viremia, quando a terapia antirretroviral é recomendada precocemente. Além disso, também são crescentes as evidências de que o tratamento precoce é capaz de preservar o sistema imune, além de evitar o dano causado aos outros sistemas orgânicos, que costumam ser indiretamente acometidos, por conta do estado de ativação imune crônica.⁶

A consequência mais temida em relação ao uso ampliado da terapia antirretroviral é a possibilidade de aumento da prevalência de infecções por vírus resistentes. O vírus HIV-1 apresenta grande variabilidade genética, que está relacionada à sua alta taxa de replicação e a baixa fidelidade da enzima transcriptase reversa, que costuma cometer erros frequentes, introduzindo mutações nas sequências produzidas.^{7; 8; 9} O uso de antirretrovirais, especialmente quando realizado de forma irregular, pode atuar como poderoso mecanismo de seleção de cepas com mutações aos antirretrovirais, levando a falha do esquema terapêutico.¹⁰ Ainda mais preocupante é a possibilidade de tais mutações serem transmitidas a outros indivíduos, que consequentemente podem apresentar falha precoce quando do tratamento inaugural. Tal possibilidade enfatiza a importância da realização de estudos de vigilância da variabilidade genética viral.

Os Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) consistem em importante serviço, disponibilizando a oportunidade de realizar sorologias para o HIV, além de outras DST, de forma rápida e descomplicada, preservando a privacidade de seus usuários. Por este motivo costuma ser o serviço mais procurado por indivíduos com recente exposição de risco. Esta característica faz com que os CTA sejam também considerados locais prioritários para realização de estudos de vigilância de variabilidade genética viral. Assim, nosso estudo tem como objetivo avaliar as características dos indivíduos diagnosticados no CTA de Fortaleza, assim como de seus isolados virais.

Metodologia

No período de outubro/2013 a setembro/2014 foi desenvolvido estudo observacional, prospectivo e transversal, avaliando indivíduos que espontaneamente procuraram o Centro de Testagem e Aconselhamento de Fortaleza (CTA), único serviço do estado com tais características, com o objetivo de realizar exames sorológicos para o HIV.

Critérios de inclusão/exclusão: Foram convidados a participar no estudo indivíduos com idade mínima de 18 anos, que obtiveram resultados reagentes em dois testes rápidos realizados durante o período do estudo. Foram excluídos indivíduos que já conheciam previamente seu estado sorológico e àqueles que não pudessem compreender os termos do termo de consentimento.

Dados clínicos e epidemiológicos: Os voluntários do estudo foram entrevistados utilizando questionário estruturado.

Aspectos éticos: o estudo foi submetido para avaliação ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e aprovado sob o número

302.336/2013. Os pacientes foram informados em detalhes sobre o estudo e foi oferecida a participação voluntária, mediante o consentimento por escrito com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Exames laboratoriais: Na fase inicial (triagem) os usuários foram submetidos à realização de testes rápidos, a partir amostra obtida de punção digital, utilizando métodos baseados em imunocromatografia (Rapid Check HIV 1/2 e Bio Manguinhos HIV 1/2), de acordo com as orientações do Ministério da Saúde.¹¹ Após a inclusão no estudo foram coletadas amostras sanguíneas, mediante punção venosa, com o objetivo de realização dos exames de rotina, preconizados nas recomendações do Ministério da Saúde, que incluem a realização de contagem de linfócitos CD4/CD8 e quantificação de carga viral.⁶ Foram ainda colhidas amostras para realização da reação de sequenciamento genético.

Contagem de CD4/CD8: realizada pela metodologia de citometria de fluxo do sistema BD FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Califórnia, USA), seguindo as especificações e procedimentos do fabricante.

Quantificação da carga viral: realizada com o kit comercial Abbott RealTime HIV-1 Assay (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), de acordo com os procedimentos e instruções do fabricante.

Genotipagem: realizada utilizando o kit comercial TruGene® Genotyping Assay e OpenGene® DNA Sequencing System (Siemens Diagnostics, USA)¹², no Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará, conforme protocolo do fabricante. Amostras não amplificadas, foram sequenciadas no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, utilizando a técnica de Nested PCR *in-house*, utilizando equipamento automático ABI 3130.¹³

Análise das seqüências: Foi realizado o sequenciamento do gene *pol* do HIV-1. As seqüências genéticas geradas da protease e da transcriptase reversa foram analisadas pelo OpenGene® DNA Sequencing System (Siemens Diagnostics, USA). As seqüências foram alinhadas pelo programa MEGA e BioEdit. As análises de mutações de resistência foram realizadas utilizando algoritmo disponível na página da Universidade de Stanford (HIVdb Program - Genotypic Resistance Interpretation Algorithm). As mutações de resistência transmitida foram identificadas empregando a ferramenta de bioinformática Calibração de Resistência Populacional (CPR) disponibilizada na página da Universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database). Os subtipos do vírus HIV-1 foram determinados e identificados empregando análises no banco de dados do REGA HIV Subtyping Tool.

Resultados

Foram atendidos no CTA 5.469 indivíduos no período do estudo, que fizeram o teste anti-HIV. Destes, 5.211 (95,3%) pessoas obtiveram resultado não reagente (negativo) no teste anti-HIV e 258 (4,7%) pessoas com resultado reagente (positivo) em dois testes rápidos para o HIV. Dentre os 258 indivíduos diagnosticados com infecção pelo HIV, foram incluídos no estudo 119 indivíduos, sendo que 108 compareceram à coleta e a reação de sequenciamento foi obtida em 105 amostras (**Figura 1**).

Figura 1: Fluxograma de pacientes avaliados no estudo.



Pesquisa para o SUS Ceará - 4

Entre os indivíduos do estudo houve predomínio do sexo masculino (86,7%). A mediana da idade foi 27 anos, com 53,4% dos pacientes com faixa etária de 18 a 28 e 83,8% entre 18 a 39 anos. O contato sexual representou a via principal de exposição (100%), sendo do tipo HSH (76,2%) a categoria de exposição predominante. Do total de pacientes, 33,3% tiveram DST nos últimos 12 meses. Quatro indivíduos (3,8%) relataram ser profissionais do sexo e 1,9% Travesti/Transexual. Com relação ao nível de escolaridade, 55,2% cursaram de 4 a 11 anos de estudo e 28,6% estudaram 12 ou mais anos. Os 105 pacientes residiam em Fortaleza ou região metropolitana, sendo 74,3% solteiros.

A mediana de linfócitos T CD4+ foi de 457 células/ μ l (1 – 1.609) e da carga viral foi de 4,34 log (2,44 - 7,01)

(**Tabela 1**). O total de 17 pacientes (16,3%) apresentava contagem de LT CD4 inferior a 200 células/ μ l, 39,4% entre 200 e 500 células/ μ l e 44,3% com CD4 superior a 500 células/ μ l. Quanto à carga viral (CV), 63,9% dos pacientes apresentavam níveis acima de 10.000 cópias/ml, 26,8% tinham viremia entre 10.000 e 1.000, enquanto 9,3% (10) estavam abaixo desse limite.

Tabela 1: Dados laboratoriais e clínicos dos 105 participantes

Variável	N (%)
Carga Viral (Cópias/ml)	
Mediana	22.106 (277 - 10.000.000)
Carga Viral (Log 10)	
Mediana	4,34 (2,44 - 7,01)
CD4 (Células/μl)	
Mediana	457 (1 - 1.609)
< 200	17 (16,3)
200 a 350	11 (10,6)
351 a 500	30 (28,8)
501 a 750	27 (26,0)
> 750	19 (18,3)
CD8(Células/μl)	
Mediana	1.239 (211 - 3.348)

As mutações que conferem resistência aos antirretrovirais foram evidenciadas em 10 pacientes (9,5%) (**Tabela 2**). Destes, sete eram do sexo masculino. Entre esses pacientes, nove foram infectados com HIV-1 do subtipo B e um com subtipo C. Entre os homens, todos os sete pacientes relataram categoria de exposição HSH, sendo um profissional do sexo, dois bissexuais e um com parceiro HIV soro positivo. Entre as mulheres, duas eram casadas e uma solteira.

Entre os casos com resistência, três (2,9%) apresentaram mutações que conferem resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN). As mutações encontradas foram D67N (n=1), T69D (n=1), V75A (n=1) e V75M (n=1). A análise do perfil de resistência sugeriu que estas resultariam em baixa resistência ao AZT e d4T e resistência intermediária ao DDI.

Seis (5,7%) pacientes apresentaram mutações que conferem resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN). As mutações encontradas foram K101E (n=2), K103N (n=3) e G190A (n=1). A mutação K103N está relacionada a elevado nível de resistência a NVP e EFV. A mutação K101E causa resistência intermediária à NVP e baixo nível de resistência a EFV, ETR e RPV. A

Pesquisa para o SUS Ceará - 4

mutação G190A confere alto nível de resistência à NVP e nível intermediário de resistência ao EFV, podendo também resultar em baixo nível de resistência a ETR e RPV.

Dois (1,9%) pacientes apresentaram mutações relacionadas aos inibidores da protease (IP). As mutações evidenciadas foram M46I (n=1) e V82L (n=1). A M46I é selecionada pelos IP e reduz a susceptibilidade ao IDV, NFV, FPV, LPV e ATV. A mutação V82L costuma ser selecionada pelo TPV e reduz a susceptibilidade à esta droga

Tabela 2: Mutações do HIV-1 relacionadas à resistência transmitida aos ARVs

Nº da amostra	Classe de Drogas	Perfil de Resistência				
		ITRNN	IP	Alto	Intermediário	Baixo
1		K103N		NVP, EFV		
2			V82L		TPV	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV
3		K101E			NVP, RPV	EFV, ETR
4			M46I			ATV, FPV, IDV, LPV, NFV
5	V75M				D4T	AZT, DDI
6		G190A		NVP	EFV	ETV, RPV
7		K101E			NVP, RPV	EFV, ETR
8	D67N, T69D	K103N		EFV, NVP	DDI	AZT, D4T
9		K103N		NVP, EFV		
10	V75A					D4T, DDI

Tabela 3 – Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com subtipo não B.

Amostra	CD4	CVLog	Subtipo/Recombinante	Sexo	Idade	Exposição	DST
A	327	5,92	F1	M	24	Heterossexual	Sim
B	546	4,82	BF (CRF12_BF)	M	30	HSH	Não
C	174	2,44	BF	M	67	Heterossexual	Sim
D	800	4,07	C	M	23	HSH	Sim
E	75	7,01	C	M	32	Heterossexual	Não
F	07	5,58	AG (CRF02_AG)	F	29	Heterossexual	Sim
G	289	4,44	F1	F	33	Heterossexual	Sim
H	467	2,48	F1	M	28	HSH	Não
I	1609	4,21	AG (CRF02_AG)	M	26	Heterossexual	Não
J	365	5,48	BF	F	27	Heterossexual	Não
K	22	5,99	BF	M	37	Heterossexual	Não
L	515	3,48	F1	M	22	HSH	Não
M	586	5,01	C	M	18	HSH	Não

HSH= Homem que faz sexo com homem.

A análise da diversidade genética do HIV-1 na região *pol* indicou o predomínio do subtipo B, que foi identificado em 86,7% das amostras. Em 13 amostras (12,4%) foram identificados subtipos não-B, sendo em 3,8% F1 e C em 2,8% (Figura 2). Foram identificados recombinantes intersubtipos em 5,7% das amostras, sendo o recombinante BF em 3,8, sendo que em um paciente foi identificado o CRF12_BF. Foi encontrado também recombinantes AG em 1,9%, identificado como CRF02_AG. As características clínicas e epidemiológicas de tais pacientes estão resumidas na tabela 3.

Discussão

Os achados gerais do estudo sugerem que a epidemia do HIV-1 em Fortaleza parece refletir algumas das principais tendências nacionais, com predominância de novos casos entre homens (86,7%), jovens (18 a 28 anos; 53,4%), da categoria de exposição HSH (76,2%), caracterizando este como o grupo populacional de maior vulnerabilidade. A prevalência de novos casos de infecção pelo HIV na população de usuários atendidos no CTA foi de 4,7%, sendo cerca de 12 vezes mais elevada que na população geral (0,4%), provavelmente devido ao perfil do grupo populacional de risco mais elevado atendido no serviço.²

Neste estudo, proporção significativa dos indivíduos apresentou níveis de linfócitos T CD4+ mais elevados, com mediana de 457 células/ μ l. Em 73,1% dos indivíduos foi verificado CD4+ superior a 350 células/ μ l, sendo 44,3% acima de 500 e 18,3% acima de 750. Por outro lado, somente 16,3% dos casos apresentavam linfócitos T CD4+ abaixo de 200, caracterizando doença avançada (AIDS). Dados recentes vêm demonstrando tendência de declínio na proporção de indivíduos com CD4+ inferior a 200, no momento do diagnóstico, nos diferentes serviços de saúde do país, que foi reduzida de 31% em 2009 para 26% até outubro de 2014. Os dados obtidos contrastam com aqueles disponíveis do estado do Ceará, que mostram que 32% dos casos diagnosticados costumam apresentar níveis de CD4 inferiores a 200, sendo esta a quinta maior proporção no país.² Isto sugere que a população atendida no CTA pode ter características distintas da população geral do estado.

A prevalência global de resistência transmitida encontrada neste estudo foi de 9,5%, sendo 2,9% aos ITRNs, 5,7% aos ITRNNs e 1,9% aos IPs, que segundo os critérios da OMS, é considerada prevalência intermediária (5 a 15%). Tais resultados corroboram com estudos realizados em diversas regiões do Brasil com prevalência de resistência transmitida de 13,9% em São Paulo;¹⁴ 11% em Florianópolis;¹⁵ 8,8% em Curitiba;¹⁶ 7,6% em São Paulo¹⁷ e 4,6% em Recife.¹⁸

Estudo realizado no Ceará, entre 2008/2009, avaliou 74 pacientes virgens de terapia antirretroviral, atendidos em duas unidades de referência secundária e terciária, apresentando mediana de CD4+ de 418 células/ μ L e CV de 4,41 log (nos adultos), evidenciando prevalência global de resistência primária de 9,5%, sendo 4,1% aos ITRNs, 2,7% aos ITRNNs e 4,1% aos IPs.¹⁹ Este dado demonstra estabilidade, do ponto de vista absoluto, no comportamento da prevalência de resistência transmitida. Porém, do ponto de vista relativo podemos perceber o aumento na proporção de isolados

resistentes aos ITRNN. Este achado representa importante repercussão clínica, visto que esta classe tem sido recomendada em nosso país como preferencial na composição dos esquemas inaugurais. Além disso, a classe dos ITRNN se caracteriza pela sua baixa barreira genética e ampla resistência cruzada entre as drogas desta classe. O conjunto dos achados sugere a necessidade de acompanhamento estreito dos pacientes que iniciam seu tratamento, buscando detectar precocemente indícios de falha terapêutica primária, comumente relacionada à resistência transmitida.

A avaliação da variabilidade genética mostrou que o subtipo B foi predominante (86,7%), seguido pelo F1 (3,8%), C (2,8%) e formas recombinantes (5,7%). Foi detectada pela primeira vez no Ceará a forma recombinante circulante CRF02_AG (1,9%). Foram encontrados 3,8% de recombinantes BF nos genes da TR e PR, respectivamente. Os dados encontrados ratificam aqueles previamente encontrados no Ceará em 2003,²⁰ 2007²¹ e 2011.¹⁹ Em 2003 foram encontrados pela primeira vez no Ceará, o subtipo F (2,7%) e recombinantes BF (2,7%).²⁰ Em 2011 foi descrito pela primeira vez no Ceará o subtipo C (5,4%),¹⁹ com achados semelhantes sendo encontrados nesse estudo (2,8% de subtipo C).

O recombinante AG (1,9%), constituído pelos subtipos A e G, foi encontrado pela primeira vez no Ceará neste estudo, um achado compatível com o aumento da diversidade genômica do vírus HIV-1, principalmente devido à intensa circulação de indivíduos infectados em viagens internacionais, sendo o Ceará rota turística com grande fluxo de pessoas de vários países do mundo, além de também aumento dos intercâmbios com universidades africanas no Ceará.

Com a política do tratamento como prevenção, desde dezembro de 2013 no Brasil, 62 mil novos indivíduos infectados iniciaram tratamento no ano de 2014 até outubro, somando quase 400 mil de indivíduos em tratamento.²

Conclusões

O estudo permitiu caracterizar que o perfil demográfico da população diagnosticada no CTA de Fortaleza possui semelhanças com as características gerais da epidemia, onde predominam os casos novos em jovens, do sexo masculino e da categoria HSH. Por outro lado, os dados de escolaridade, além do melhor perfil imunológico mostram que os usuários do CTA possuem características privilegiadas, que não espelham o perfil epidemiológico e clínico descritos em nosso estado. Tais informações sugerem que o CTA, como estratégia de vigilância passiva, pode não estar favorecendo o diagnóstico entre as populações de maior vulnerabilidade.

O estudo dos isolados virais demonstram níveis intermediários de resistência transmitida, embora assinala o crescimento da prevalência de mutações para os ITRNN, podendo representar risco mais elevado de falha precoce em pacientes iniciando terapia. Tais dados sugerem monitoramento cuidadoso de pacientes com diagnóstico recente e alimentam a polêmica discussão em relação ao custo-benefício da realização do exame de genotipagem em tais pacientes. Embora a maioria dos isolados virais terem sido caracterizados como do subtipo B, historicamente prevalente no país e no estado, a maior diversidade de subtipos não-B demonstram a evolução temporal da variabilidade genética em nossa cidade.

A transmissão de cepas do HIV-1 resistentes pode implicar no aumento da possibilidade de falha primária e na amplificação de resistência, restringindo as opções terapêuticas posteriores. Por este, estudos de vigilância de mutações de resistência aos ARVs são fundamentais para o monitoramento da epidemia regional e para o planejamento da gestão em saúde, principalmente no contexto do uso ampliado de TARV no Brasil.

Referências

- 1 UNAIDS. **UNAIDS Gap Report: Ending the AIDS epidemic**. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS - World Health Organization 2014.
- 2 BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST**. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília-DF: Ministério da Saúde 2014.
- 3 PALELLA, F. J. J. et al. Mortality in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era: Changing Causes of Death and Disease in the HIV Outpatient Study. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 43, n. 1, p. 27-34, 2006. ISSN 1525-4135. Disponível em: <http://journals.lww.com/jaids/Fulltext/2006/09000/Mortality_in_the_Highly_Active_Antiretroviral.5.aspx>.
- 4 COHEN, M. S. et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. **N Engl J Med**, v. 365, n. 6, p. 493-505, Aug 11 2011. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767103>>.
- 5 BRASIL. **Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de AIDS.** Lei Nº 9.313. CIVIL, C. Brasília-DF: Presidência da República 1996.
- 6 _____. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília-DF: Ministério da Saúde 2013.
- 7 PERELSON, A. S. et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1582-6, Mar 15 1996. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599114>>.
- 8 ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1171-3, Nov 25 1988. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
- 9 PRESTON, B. D.; POIESZ, B. J.; LOEB, L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1168-71, Nov 25 1988. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460924>>.
- 10 CLAVEL, F.; HANCE, A. J. HIV drug resistance. **N Engl J Med**, v. 350, n. 10, p. 1023-35, Mar 4 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic)0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999114>>.
- 11 BRASIL. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV**. DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília-DF: Ministério da Saúde 2014.

- 12 GRANT, R. M. et al. Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1586-93, Apr 2003. ISSN 0095-1137(Print) 0095-1137 (Linking).
- 13 SNOECK, J. et al. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 2, p. 694-701, Feb 2006. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking).
- 14 SANABANI, S. S. et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in Sao Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25869, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022460>>.
- 15 GRAF, T. et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naive patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. **J Clin Virol**, v. 51, n. 3, p. 186-91, Jul 2011. ISSN 1873-5967 (Electronic)1386-6532 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622023>>.
- 16 FERREIRA, J. L. et al. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 800-8, Dec 2008. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148420>>.
- 17 FERREIRA, J. L. et al. Transmitted Drug Resistance among People Living with HIV/Aids at Major Cities of São Paulo State, Brazil. **Adv Virol**, v. 2013, p. 878237, 2013. ISSN 1687-8639 (Print)1687-8639 (Linking).
- 18 CAVALCANTI, A. M. et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 450-7, Jun 2012. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking).
- 19 ARRUDA, E. et al. Short communication: intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceara State, Northeast Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, n. 2, p. 153-6, Feb 2011. ISSN 1931-8405 (Electronic)0889-2229 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929346>>.
- 20 GADELHA, S. R. et al. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 461-3, Jun 2003. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking).
- 21 CAVALCANTI, A. M. et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 785-92, Nov 2007. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking).