

**MANUAL TÉCNICO
PARA O DIAGNÓSTICO
DA INFECÇÃO PELO HIV**

Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

**MANUAL TÉCNICO
PARA O DIAGNÓSTICO
DA INFECÇÃO PELO HIV**

Brasília, dezembro de 2013

© 2013 Ministério da Saúde.

É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é da área técnica do Departamento de Aids, DST e Hepatites Virais.

Informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais
SAF Sul Trecho 2, Bloco F, Torre 1, Edifício Premium
CEP: 70070-600, Brasília – DF
E-mail: aids@aids.gov.br
Home Page: www.aids.gov.br

Ministro da Saúde

Alexandre Rocha Santos Padilha

Secretário de Vigilância em Saúde

Jarbas Barbosa da Silva Júnior

Diretor do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

Fábio Mesquita

Diretora-Adjunta

Adele Schwartz Benzaken

Coordenadora de Laboratório - CLAB

Miriam Franchini

Projeto gráfico e diagramação

Ana Cristina e Silva Aguiar
Fernanda Dias Almeida Mizael

Autores

Elaine Sanae Sumikawa Wersom
Leonardo Rapone da Motta
Maria Luiza Bazzo
Miriam Franchini
Orlando da Costa Ferreira Junior

Revisão

Ana Flávia Nacif P. Coelho Pires
Ester Cerdeira Sabino
Maria Inês de Moura Pardini
Maria Tereza Magalhães Morais
Mariza Gonçalves Morgado
Roberta Barbosa Lopes Francisco
Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Colaboradores

Andréa Cristina Vanni
Elvira Lúcia Soares
Mariana Villares
Regina Aparecida Comparini

APRESENTAÇÃO

O Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde tem trabalhado constantemente na busca de uma resposta sustentável à epidemia de HIV/aids.

Nossas ações e propostas são pautadas em evidências científicas, na evolução tecnológica e no diálogo com todos os atores envolvidos na luta contra a epidemia.

Nesse sentido, novas políticas têm sido adotadas com o objetivo de ampliar o diagnóstico, introduzir novas metodologias e fluxos que permitam o diagnóstico precoce da infecção pelo HIV, impactando na transmissão do vírus e no surgimento de novos casos.

Dentre as inovações propostas, está a política do Tratamento como Prevenção (TasP, da sigla em inglês *Treatment as Prevention*), que oferece a todos os pacientes a possibilidade de iniciar o tratamento logo após a confirmação do diagnóstico. Essa medida melhora a qualidade de vida das pessoas diagnosticadas e reduz a probabilidade de transmissão do vírus.

Com o intuito de ampliar as possibilidades de diagnóstico, além de orientar e subsidiar, especialmente, os(as) profissionais de saúde na realização do diagnóstico da infecção do HIV, foi elaborado este Manual Técnico.

Estão apresentados cinco fluxogramas que permitem o diagnóstico seguro da infecção em indivíduos de todas as idades. Essa proposta viabiliza a realização do diagnóstico em diferentes situações e localidades nas quais a infraestrutura laboratorial esteja ou não disponível, na capacidade necessária ao atendimento de todos os cidadãos que buscam esse diagnóstico.

Esperamos que os profissionais e serviços façam as escolhas adequadas à sua realidade local, de modo a viabilizar o acesso de todos os indivíduos que desejam conhecer seu estado sorológico. Ao construir essas propostas, consideramos também a agilidade da resposta ao indivíduos, seu encaminhamento para assistência médica e a relação custo-efetividade da testagem.

Desejamos a todos sucesso no seu trabalho e nos colocamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida por meio do seguinte endereço de e.mail: clab@aids.gov.br

Jarbas Barbosa da Silva Júnior

Secretário de Vigilância em Saúde

Fábio Mesquita

Diretor do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

Sumário

Glossário	9
Lista de abreviaturas	11
1. Introdução.....	14
2. A estrutura do HIV	15
2.1. Classificação filogenética do HIV	17
2.2. Subtipos do HIV-1	17
3. Infecção e resposta imune contra o HIV.....	19
4. Diagnóstico da infecção pelo HIV	20
4.1. Imunoensaio de triagem	21
4.1.1. Primeira Geração	22
4.1.2. Segunda Geração	23
4.1.3. Terceira Geração	23
4.1.4. Quarta Geração	24
4.2. Testes Rápidos (TR).....	25
4.2.1. Situações e locais nas quais o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais recomenda a utilização de Testes Rápidos	26
4.3. Ensaio complementares.....	27
4.4. Diagnóstico por Detecção Direta do HIV	30
4.5. Diagnóstico utilizando amostras de sangue seco em papel filtro.....	30
5. Sistema de estagiamento laboratorial da infecção recente pelo HIV: Classificação de Fiebig.....	31
5.1. Estágios da infecção recente.....	31
5.2. Limitações do modelo de Fiebig	32
6. Falhas e erros no diagnóstico da infecção pelo HIV.....	34
7. Tecnovigilância	35
8. Fluxogramas de testagem para HIV	36
8.1. Estratégias para o diagnóstico da infecção pelo HIV empregando Testes Rápidos	36

Fluxograma 1.....	38
Fluxograma 2.....	40
8.2. Propostas de estratégias de testagem em laboratórios.....	41
Fluxograma 3.....	42
Fluxograma 4.....	45
Fluxograma 5.....	48
9. Estratégias para identificação precoce da infecção pelo HIV em de crianças menores de 18 meses	50
10. Situações Especiais do Diagnóstico da Infecção pelo HIV.....	51
10.1. Recomendação para diagnóstico de infecção aguda pelo HIV-1	51
10.2. Recomendações para diagnóstico da infecção pelo HIV-2	51
Referências	54

Glossário⁶

Amostra do Paciente ou Amostra Biológica: é uma porção de fluido corporal, células ou tecido retirado para exame, estudo ou análise.

Anticorpo: é uma proteína (imunoglobulina) que se liga especificamente a uma substância ao organismo estranha. Anticorpos são produzidos por linfócitos B em resposta a uma infecção ou imunização.

Antígeno: qualquer substância ou material estranho que possa estimular a produção de anticorpos em um organismo e que seja reconhecido especificamente por estes.

Controladores de Elite: (do inglês, *elite controllers*) são indivíduos que têm a infecção pelo HIV, apresentam resultados reagentes nos testes sorológicos que detectam anticorpos e não estão em tratamento antirretroviral, porém apresentam consistentemente (por pelo menos 1 ano) Carga Viral inferior ao limite de detecção dos ensaios rotineiramente utilizados. Estima-se que menos de 1% dos pacientes HIV-1 soropositivos pertença a esse grupo.

Especificidade clínica ou especificidade diagnóstica: refere-se à capacidade de um ensaio apresentar resultado negativo ou não reagente quando os indivíduos não apresentam uma desordem clínica ou doença.

Falso-negativo: é um resultado negativo em um teste para uma doença ou condição quando a doença ou condição de interesse está presente.

Falso-positivo: é um resultado positivo em um teste para uma doença ou condição quando a doença ou condição de interesse está ausente.

Fase Eclipse: é o intervalo de tempo entre a infecção pelo HIV e a primeira detecção por meio de um ensaio virológico ultrasensível.

Imunidade Inata: mecanismo de defesa inicial contra infecções. Inclui células fagocíticas, células NK (do inglês *natural killer*), células dendríticas, complemento, citocinas e quimiocinas.

Imunidade Mediada por Células: reação imunológica específica mediada por linfócitos T.

Imunoensaio: é um método que detecta a presença de um complexo antígeno-anticorpo em uma amostra biológica.

Imunosilenciosos: (do inglês, *immunosilents*) são indivíduos que possuem níveis baixos ou mesmo ausência de anticorpos específicos e, dessa forma, não são detectados nos testes sorológicos.

Infecção Aguda pelo HIV: é a primeira fase da infecção até o estabelecimento do *set point* de Carga Viral, que dura em torno de três (3) meses. Durante a infecção aguda existe uma fase de detecção viral que antecede a detecção de anticorpos contra o vírus.

Infecção Crônica: é a fase da infecção após a completa maturação da resposta dos anticorpos. Geralmente ocorre entre 6 e 12 meses após a soroconversão e se estende até a definição de aids.

Infecção Recente: é a fase entre o surgimento de anticorpos em quantidade detectável por um teste sorológico até a completa maturação da resposta dos anticorpos.

Janela Clínica ou Janela Aguda ou Período de Incubação: são termos relacionados que definem o período entre o momento da infecção e o aparecimento dos sintomas e/ou sinais clínicos.

Janela de Soroconversão ou Janela Imunológica ou Janela Sorológica: é a duração do período entre a infecção pelo HIV até a primeira detecção de anticorpos anti-HIV, a qual inclui a fase aguda e a fase eclipse (aguda + eclipse).

Janela Diagnóstica: é um conceito mais amplo do que o de janela imunológica ou sorológica. O período de janela diagnóstica é o tempo decorrido entre a infecção e o aparecimento ou detecção de um marcador da infecção, seja ele RNA viral, DNA proviral, antígeno p24 ou anticorpo. A duração desse período depende do tipo do teste, da sensibilidade do teste e do método utilizado para detectar o marcador.

Limite de Detecção: é a menor concentração ou quantidade que um método pode detectar com certeza para um dado procedimento analítico. Ele depende da amplitude da leitura do branco e da precisão dessa medida.

Padrão-Ouro: é uma referência padrão que se utiliza para comparar um material ou processo, visando a melhor aproximação da verdade ou valor verdadeiro.

Prevalência: número total de casos existentes de uma doença ou condição clínica (novos e antigos) de uma população em um determinado local e período de tempo.

Relação DO/CO: nos testes imunoenzimáticos, o valor da reação DO/CO é o **resultado da divisão** da densidade ótica (obtida com a amostra teste) pelo ponto de corte do teste (determinado pelo fabricante). Outros testes para HIV como, por exemplo, metodologias ELFA e quimioluminescência têm leitura em sistemas diferentes de densidade; nesses casos, utiliza-se a expressão S/CO (S = amostra, do inglês *sample*).

Resposta Imune Humoral: refere-se à resposta imune envolvendo a produção de anticorpos em resposta a um estímulo do antígeno.

Resposta Primária: resposta imune resultante do primeiro encontro com o antígeno, que se caracteriza pela produção de IgM.

Sensibilidade Clínica ou Sensibilidade Diagnóstica: refere-se à capacidade de um ensaio apresentar resultado positivo ou reagente quando o indivíduo apresenta uma desordem clínica ou doença.

Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids): síndrome clínica caracterizada por profunda imunodepressão decorrente da infecção pelo HIV. A definição clínica de início da aids é o aparecimento de infecções oportunistas e/ou neoplasias. Desde 1993, a aids também pode ser definida por critério laboratorial da contagem de linfócitos T CD4⁺.

Teste de Triagem ou Teste Inicial: é o primeiro teste realizado para identificar possíveis indivíduos infectados pelo HIV.

Teste Molecular Qualitativo para o HIV: é um método de diagnóstico do HIV que detecta a presença ou ausência do vírus (RNA ou DNA-proviral) na amostra analisada.

Teste Molecular Quantitativo para o HIV: é um método que permite quantificar a Carga Viral do HIV em determinada amostra.

Teste Rápido: é um dispositivo de teste de uso único, que não depende de infraestrutura laboratorial e que produz resultado em tempo igual ou inferior a 30 minutos.

Testes Complementares: são testes utilizados após a realização de outro teste que apresentar resultado reagente. Os dois testes devem possuir natureza antigênica e/ou princípios metodológicos diferentes.

Testes Confirmatórios: são testes ou conjuntos de testes que podem definir o diagnóstico de uma amostra, após um resultado inicial reagente.

Valor Preditivo Negativo: é a proporção de indivíduos com um resultado negativo e que não apresentam a doença ou condição de interesse. Esse valor, normalmente, é apresentado em porcentagem.

Valor Preditivo Positivo: é a proporção de indivíduos com um resultado positivo e que apresentam a doença ou condição de interesse. Esse valor, normalmente, é apresentado em porcentagem.

Virion: é a partícula viral completa que está estruturalmente intacta e é infecciosa.

Lista de Abreviaturas

Ac: Anticorpo

AEQ: Avaliação Externa de Qualidade

Ag: Antígeno

Aids: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARV: Antirretroviral

C: Controle

CO: ponto de corte (do inglês, *cut-off*)

CRF: forma Recombinante Circulante (do inglês, *Circulating Recombinant Form*)

CTA: Centro de Testagem e Aconselhamento

CV: Carga Viral

D: Detectável

DBS: Sangue seco em papel de filtro (do inglês, *Dried Blood Spots*)

DDAHV: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DO: Densidade Ótica

DPP: Plataforma de Migração Dupla/Imunocromatografia de Dupla Migração

DST: Doença Sexualmente Transmissível

EA: Eventos Adversos

Env: Envelope

FO: Fluido Oral

Gag: Grupo antigênico (do inglês, *group-specific antigen*)

Gp: Glicoproteína

GPGR: Variante brasileira do HIV (P = Prolina)

GWGR: Variante brasileira do HIV (W = Triptofano)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)

IB: Imunoblot

IBR: Imunoblot Rápido

IE: Imunoensaio

IFI: Imunofluorescência Indireta

Ig: Imunoglobulina

JD: Janela Diagnóstica

kd: kilodalton

LIA: Imunoensaio em linha (do inglês, *Line Immuno Assay*)

LTR: Extremidades em repetições longas (do inglês, *Long Terminal Repeat*)

MS: Ministério da Saúde

NAT: Tecnologia de Amplificação de Ácidos Nucleicos (do inglês, *Nucleic Acid Amplification Technology*)

ND: Não Detectável

Nef: Fator Negativo

nm: nanômetro

NR: Não Reagente

P: Proteína

Pol: Polimerase

QT: Queixas Técnicas

R: Reagente

Rev: Regulador da transcrição do gene viral (do inglês, *Regulator of Expression of Virion Proteins*)

RF: Formas Recombinantes (do inglês, *Recombinant Forms*)

RNA: Ácido Ribonucleico

ST: Sangue Total

T: Teste

TasP: Tratamento como prevenção (do inglês, *Treatment as Prevention*)

Tat: Proteína transativadora

TM: Teste Molecular

TR: Teste Rápido

URF: Forma Recombinante Única (do inglês, *Unique Recombinant Form*)

US: Unidade de Saúde

Vif: Fator de infecciosidade viral

VPP: Valor Preditivo Positivo

Vpr: Proteína viral "R"

Vpu: Proteína viral "U"

WB: Western Blot

**MANUAL TÉCNICO
PARA O DIAGNÓSTICO
DA INFECÇÃO PELO HIV**

1. INTRODUÇÃO

São vários os desafios associados à implementação de novos fluxogramas que visam caracterizar com acurácia e precisão uma **amostra biológica**⁶ submetida a testes para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Esses desafios abrangem a reestruturação ou planejamento de políticas públicas e incluem desde questões estruturais (políticas, legais, custo-efetividade, etc.) e também às operacionais (formação de pessoal, validação dos testes e boas práticas de laboratório).

Alguns desafios permanecem constantes: a evolução tecnológica que introduz periodicamente novas metodologias no mercado de testes, sua aprovação pelas agências reguladoras e ainda sua aceitação para uso na rotina diária do diagnóstico em diferentes situações e instalações.

Resultados indeterminados ou inconclusivos, **falso-positivos**⁶ ou **falso-negativos**⁶, podem ser obtidos com a utilização de qualquer teste ou metodologia, independentemente do fluxograma utilizado, seja devido à limitação da própria metodologia e do que ela é capaz de detectar na amostra analisada, seja pela característica singular com que a infecção pode progredir em diferentes indivíduos.

A reatividade cruzada de **anticorpos**⁶ que podem estar presentes na amostra em virtude de várias doenças autoimunes, ou mesmo na gravidez, dentre outras situações, pode produzir resultados falso-positivos ou indeterminados em qualquer ensaio sorológico.

Em amostras que apresentam resultados indeterminados em testes como o Western Blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido, os Testes Moleculares (TM) podem ser muito úteis para confirmar a presença da infecção pelo HIV. Porém, existe um período entre a exposição do indivíduo e a detecção do vírus, no qual nenhum teste atualmente disponível pode definir o resultado da amostra.

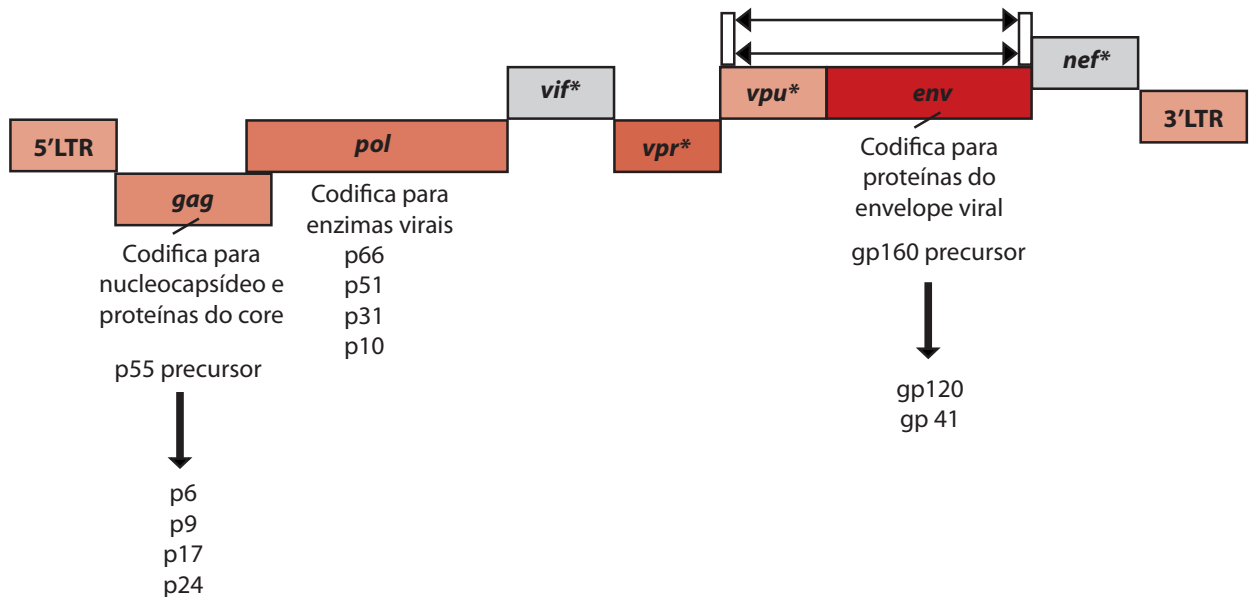
Por fim, é essencial descrever de forma clara e consistente o significado dos resultados obtidos a partir da utilização de um fluxograma, esclarecendo suas vantagens, desvantagens e limitações. Os fluxogramas também indicam quais caminhos devem ser seguidos para solucionar casos excepcionais que requerem testes adicionais, até a correta caracterização da amostra submetida aos testes propostos no fluxograma escolhido em um determinado serviço.

2. A ESTRUTURA DO HIV

O HIV é uma partícula esférica, que mede de 100 a 120 nm de diâmetro, pertencente ao gênero *Lentivirinae* e família *Retroviridae*, apresentando em seu núcleo duas cópias de RNA de cadeia simples, encapsuladas por uma camada proteica ou núcleo-capsídeo, capsídeo e um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica.

O genoma do HIV inclui três principais genes que codificam as proteínas estruturais e enzimas virais: *gag*, *env* e *pol*. A nomenclatura das proteínas virais utiliza a abreviação “gp” para glicoproteína ou “p” para proteína, seguida de um número que indica o peso molecular em kilodaltons (kd). O gene *gag* codifica a p55, a partir da qual quatro proteínas estruturais do capsídeo são formadas: p6, p9, p17 e p24. O capsídeo que circunda o ácido nucleico viral contém p24, p6 e p9, enquanto a p17 se encontra em uma camada entre o núcleo proteico e o invólucro, denominada matriz proteica, a qual reveste a superfície interna da membrana viral.

Figura 1 - O genoma do HIV-1. As localizações relativas dos principais genes no genoma do HIV-1 são indicadas, assim como as principais proteínas que cada gene codifica (adaptado de Miller, L. E., 2010).



*Genes regulatórios

O gene *env* codifica as glicoproteínas gp160, gp120, e gp41, que são encontradas no envelope viral. A gp160 é uma proteína precursora, que é clivada para formar a gp120 e gp41. A gp120 se projeta na superfície viral na forma trimérica, enquanto a gp41 é uma glicoproteína transmembrana e se associa à gp120. Ambas gp120 e gp41 estão envolvidas na fusão e ligação aos receptores de HIV nas células do hospedeiro.

O terceiro gene estrutural, *pol*, codifica as enzimas p66 e p51, que compõem a enzima transcriptase reversa (RT), necessária à replicação do HIV. Essas proteínas são subunidades da transcriptase reversa p31, ou integrase, a qual medeia a integração do DNA viral no genoma das células do hospedeiro, e a p10, uma protease que cliva precursores proteicos em unidades ativas menores. A proteína p66 também está envolvida na degradação do RNA original do HIV. Essas proteínas estão localizadas no núcleo, sendo associadas ao RNA do HIV.

Vários outros genes no genoma do HIV codificam produtos com função reguladora ou acessória. Embora esses produtos não sejam parte integrante da estrutura viral, eles atuam no controle da replicação viral e infectividade. O gene *tat* (transativador) codifica a p14, uma proteína reguladora que ativa a transcrição de genes provirais do HIV. O gene *rev* (que regula a expressão das proteínas do vírion) codifica a p19, uma proteína que transporta o RNA viral para a tradução no citoplasma. O gene *nef* codifica a p27, a qual apresenta múltiplas funções, incluindo a modificação da célula hospedeira para aumentar a replicação viral e torná-la menos suscetível a ser destruída pelo sistema imune do hospedeiro. O gene *vpu* (proteína viral “U”) codifica a p16, uma proteína com múltiplos papéis,

incluindo a montagem de forma eficiente e brotamento dos vírions para fora das células hospedeiras infectadas e a promoção da morte da célula hospedeira. O gene *vpr* (proteína viral "R") codifica a p15, que auxilia na integração do DNA do HIV no núcleo da célula hospedeira. O gene *vif* codifica a p23, que atua como um fator de infecciosidade viral, estabilizando o DNA HIV recém-sintetizado e facilitando o seu transporte para o núcleo.

O HIV-2 também apresenta os genes *gag*, *env*, *pol* e genes regulatórios e acessórios com funções semelhantes às observadas no HIV-1. A homologia entre os genomas dos dois vírus é de aproximadamente 50%. As regiões *gag* e *pol* do genoma viral apresentam maior homologia entre os diferentes tipos virais, ao contrário da região *env*, que apresenta diferenças significativas no HIV-1 e HIV-2. As proteínas do HIV-2 têm funções equivalentes às do HIV-1; entretanto, apresentam diferenças na composição de aminoácidos e no peso molecular, conforme a tabela 1:

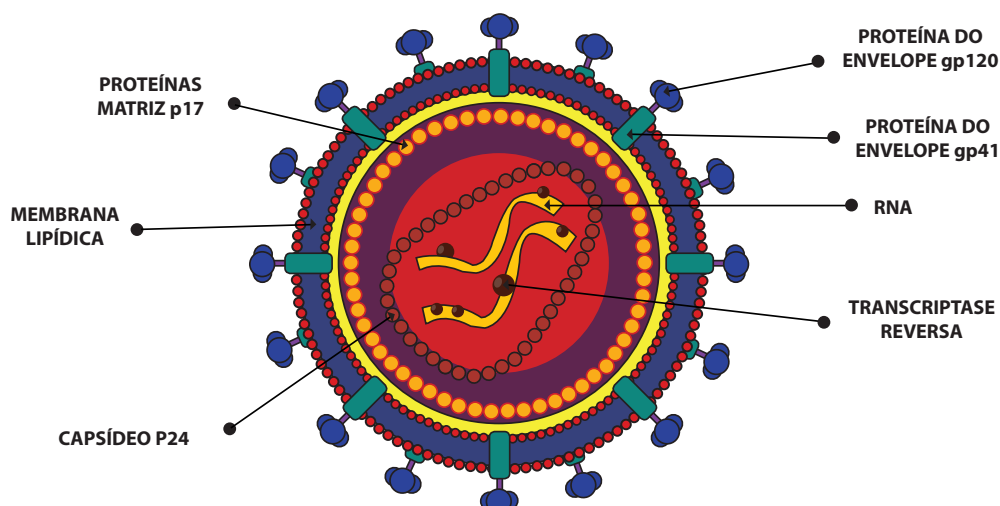
Tabela 1 – Principais Proteínas do HIV com Importância Diagnóstica

Genes do HIV	Produtos do HIV	Peso Molecular das Proteínas e Glicoproteínas Virais	
		HIV-1	HIV-2
Env	Precursor	gp160	gp140
	Glicoproteína externa	gp120	gp105/125
	Glicoproteína transmembranar	gp41	gp36
Pol	Transcriptase Reversa	p66	p68
	Transcriptase Reversa	p51	p53
	Integrase	p31	p31/34
Gag	Precursor	p55	p56
	Cerne	p24	p26
	Matriz	p17	p16

Adaptado de: CLSI. Criteria for Laboratory Testing and Diagnosis of HIV Infection; Approved Guideline. CLSI document M53-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011

Os principais componentes virais com utilidade diagnóstica incluem as proteínas do envelope viral (gp160, gp120 e gp41), as proteínas codificadas pelo gene *gag* (p55, p24 e p17) e as proteínas codificadas pelo gene *pol* (p66, p51, p31). A figura 2 apresenta a localização das principais proteínas na partícula viral de HIV-1.

Figura 2 - A estrutura do HIV-1.

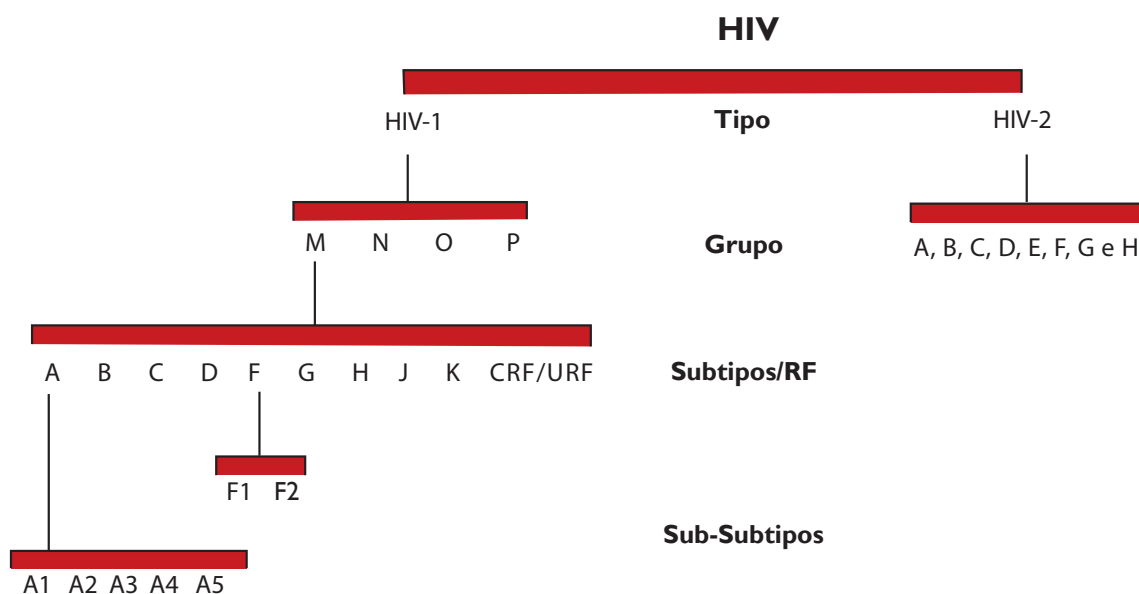


2.1. Classificação filogenética do HIV

A classificação do HIV é feita por meio da análise filogenética de sequências nucleotídicas dos vírus. A classificação atual é hierárquica e consiste em tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes (Figura 3). O HIV-1 e o HIV-2 são tipos distintos do vírus, mais distantes filogeneticamente.

O HIV-1 é subdividido em 4 grupos: grupo M (do inglês, *major* ou majoritário), grupo N (do inglês, *new* ou *non-M, non-O*, ou novo, não-M, não-O), grupo O (do inglês, *outlier*) o mais divergente dentre os grupos, e ainda o grupo P. A maioria das infecções ocorre com HIV-1 do grupo M, o qual é diferenciado em subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K). Os subtipos A e F, por sua vez, são subdivididos em A1, A2, A3, A4 e A5, e em F1 e F2, respectivamente. Quando um indivíduo é portador de uma infecção mista, composta por dois ou mais vírus de linhagens (subtipos) diferentes, pode ocorrer a transferência de material genético entre eles, dando origem às formas recombinantes (RF, do inglês *recombinant forms*). Caso a transmissão de uma forma recombinante tenha sido documentada em mais de três indivíduos, passa a ser denominada como CRF (forma recombinante circulante, do inglês, *circulating recombinant form*). Formas recombinantes que foram identificadas, mas cujas transmissões são desconhecidas ou não relatadas, são definidas como URF (forma recombinante única ou, do inglês, *unique recombinant form*). A variação genética do HIV tem implicações tanto na biologia do vírus e sua transmissão, quanto na reatividade e reação cruzada em testes diagnósticos que detectem a presença de anticorpos específicos para os **antígenos**⁶ virais.

Figura 3 - Representação esquemática da classificação do HIV.



2.2. Subtipos do HIV-1

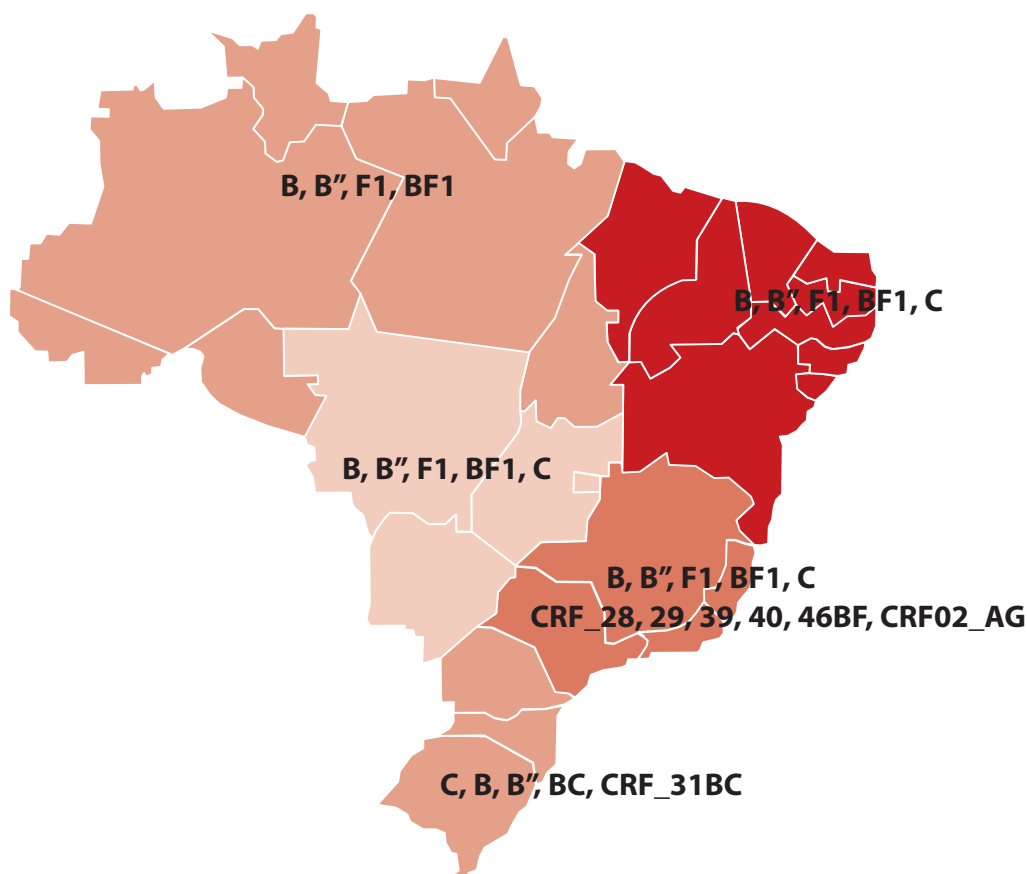
A epidemia HIV/aids no Brasil é complexa quanto à distribuição e prevalência dos diferentes subtipos de HIV-1, se comparada aos outros países da América do Sul. O subtipo B do HIV-1 tem sido descrito como o mais prevalente no Brasil, seguido pelo F1 e formas recombinantes únicas B/F1 nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, enquanto que na região Sul observa-se uma alta prevalência do subtipo C, com valores que variam de um estado a outro, e do CRF31_BC. Além desses, já foram relatados alguns casos de infecções pelos subtipos A, D, CRF02_AG e genomas mosaicos em potencial, envolvendo recombinação ou infecção dupla entre B/F1, B/C e F1/D e pelo menos 5 CRFs_BF1 (28, 29, 39, 40 e 46) e o CRF31_BC. Em adição à diversidade inter-subtipo, diferenças genéticas e antigênicas também foram descritas entre linhagens do subtipo B circulantes no Brasil, com a identificação de uma variante denominada B". Esta difere do subtipo B clássico pela presença do motivo GWGR no topo da alça V3 de gp120 do envelope, no lugar de GPGR. Em algumas áreas do Brasil, a variante B" mostrou-se altamente prevalente, correspondendo a 57% dos subtipos B detectados em Ribeirão Preto (SP) e 37% dos do Rio de Janeiro (RJ).

Ao longo do tempo, tem-se verificado um aumento na complexidade da composição de subtipos virais e formas recombinantes nas diferentes regiões brasileiras. No Norte do país, foi descrita a presença do subtipo B em 38,7% das amostras analisadas de Manaus, seguida por uma alta porcentagem de recombinantes B/F (35,5%) e do subtipo F (16%). Já em um trabalho mais recente, analisando amostras de Belém e de Macapá, verificou-se um predomínio do subtipo B (88,3% e 97,1%), seguido de F1 (9,3% e 2,8%), com identificação do subtipo D e do CRF02_AG. No Nordeste, diversos trabalhos apontam para uma predominância do subtipo B, registrando uma prevalência de, aproximadamente, 80%, seguido de recombinantes BF1 na Bahia e do subtipo F1 nos demais estados. No Centro-Oeste, verificou-se uma alta prevalência de subtipo B no Distrito Federal (96%), seguido pelo subtipo F1 e recombinantes BF1. Em um estudo incluindo amostras de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, verificou-se uma prevalência de 69,9% do subtipo B, 1,7% do F1, 1% do C e 14,5% de formas recombinantes envolvendo os subtipos B, C, D e F. Estudos mais recentes apontam para um incremento na prevalência do subtipo C em mulheres dessa região.

Inúmeros trabalhos têm procurado avaliar a distribuição dos subtipos de HIV-1 na região Sudeste. De modo geral, todos apontam para um predomínio do subtipo B, seguido do subtipo F1 e URF_BF1 (10%-15%), além de casos isolados do subtipo C, verificados no Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte. Formas recombinantes circulantes CRF28_BF1, CRF29_BF1 e CRF46_BF já foram identificadas em São Paulo e CRF39_BF1 e CRF40_BF1 no Rio de Janeiro, além da identificação de infecções por CRF02_AG no Rio de Janeiro. Estudo recente aponta para um incremento da presença do subtipo C em São Paulo.

Os primeiros estudos de subtipagem de amostras de HIV-1 provenientes da região Sul evidenciaram perfil diferenciado, com alta prevalência do subtipo C. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido realizados nessa região, apontando para grande proporção de infecções pelo subtipo C do HIV-1 nos estados do Paraná (30%), Santa Catarina (49-64%) e Rio Grande do Sul (27%-40%), seguidos pelos subtipos B, F1, recombinantes BF, BC, além do CRF31_BC, descrito em Porto Alegre e Rio Grande (RS).

Figura 4 - Distribuição geográfica dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 identificados no Brasil (atualizado a partir de Morgado et al., 2002).



3. INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE CONTRA O HIV

A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorre através das mucosas do trato genital ou retal durante a relação sexual. Nas primeiras horas após a infecção pela via sexual, o HIV e células infectadas atravessam a barreira da mucosa, permitindo que o vírus se estabeleça no local de entrada e continue infectando linfócitos T CD4⁺ (T CD4⁺), além de macrófagos e células dendríticas.

Após a transmissão do vírus, há um período de aproximadamente 10 dias, denominado de **fase eclipse**⁶ (do inglês, *eclipse phase*), antes que o RNA viral seja detectável no plasma. Estudos que utilizaram técnicas avançadas de sequenciamento genético das primeiras partículas virais detectadas no plasma permitiram demonstrar que aproximadamente 80% das infecções sexuais pelo HIV-1 dos subtipos B e C são iniciadas por um único vírus. A homogeneidade do vírus, dito fundador, indica que o estabelecimento da infecção é resultado de um único foco de linfócitos T CD4⁺ infectados da mucosa. A replicação viral nesse local é auxiliada, em parte, pela resposta imunológica inata que encaminha uma quantidade adicional de células T suscetíveis ao foco da infecção.

A partir dessa pequena população de células infectadas, o vírus é disseminado inicialmente para os linfonodos locais e depois sistemicamente e em número suficiente para estabelecer e manter a produção de vírus nos tecidos linfoides, além de estabelecer um reservatório viral latente, principalmente em linfócitos T CD4⁺ de memória. A replicação viral ativa e a livre circulação do vírus na corrente sanguínea causam a formação de um pico de viremia por volta de 21 a 28 dias após a exposição ao HIV. Essa viremia está associada a um declínio acentuado no número de linfócitos T CD4⁺.

Na fase de expansão e disseminação sistêmica, há a indução da resposta imunológica, mas esta é tardia e insuficiente em magnitude para erradicar a infecção. A ativação imune, por outro lado, produz uma quantidade adicional de linfócitos T CD4⁺ ativados que servem de alvo para novas infecções. Ao mesmo tempo, o número crescente de linfócitos T CD8⁺ (T CD8⁺) exerce um controle parcial da infecção, mas não suficiente para impedir, em ausência de terapia, a lenta e progressiva depleção de linfócitos T CD4⁺ e a eventual progressão para aids.

A ativação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ específicos (TC CD8⁺) contra o HIV ocorre normalmente antes da soroconversão. O aparecimento de uma resposta imune celular HIV-específica e a subsequente síntese de anticorpos anti-HIV levam a uma queda da Carga Viral plasmática (viremia) - até um nível (*set point*) que é específico de cada indivíduo - e à cronicidade da infecção pelo HIV. A resposta imune mediada por células é mais importante do que a **resposta imune humoral**⁶ no controle da replicação viral durante a **infecção aguda**⁶, mas os anticorpos têm um papel relevante na redução da disseminação do HIV na fase crônica da infecção.

A resposta imunológica humoral contra vários antígenos viral é vigorosa. A maioria das proteínas do HIV é imunogênica, mas uma resposta de anticorpos precoce e preferencial é induzida contra glicoproteínas do envelope, gp120 e gp41, e contra a proteína do core/capsídeo viral, a p24.

Como em qualquer outra infecção viral, a primeira classe de anticorpo produzida durante uma **resposta primária**⁶ é a imunoglobulina M (IgM). Devido à persistência do HIV, nosso organismo é continuamente exposto aos mesmos antígenos e a produção inicial de IgM é substituída pela produção de imunoglobulina G (IgG). Entretanto, ao contrário de outras doenças infecciosas, a presença da IgM não permite diferenciar uma **infecção recente**⁶ de uma **infecção crônica**⁶, tendo em vista que a IgM pode reaparecer em outros momentos durante o curso da infecção. A IgG anti-HIV atinge níveis séricos elevados e persiste por anos, enquanto os níveis séricos de IgM tendem a desaparecer com o tempo ou apresentar padrão de intermitência.

É observado um aumento da afinidade do anticorpo pelo antígeno, ou seja, os anticorpos de baixa afinidade que são produzidos no início da resposta humoral são pouco a pouco substituídos por anticorpos de alta afinidade. Este é um fenômeno devido à ocorrência de mutações somáticas em determinadas regiões (*hot spots*) dos genes que codificam a imunoglobulina (Ig). Essas mutações ocorrem ao acaso e o aparecimento de clones de linfócitos B com maior especificidade antigênica é o resultado de um processo de seleção positiva decorrente dessas mutações. Essa característica de aumento de afinidade (ou avidez), juntamente com o aumento da concentração sérica de anticorpos específicos anti-HIV durante a fase inicial da resposta imune humoral, é a base racional para o desenvolvimento de testes laboratoriais que classificam a infecção em recente ou crônica.

4. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV

As estratégias de testagem em laboratório têm o objetivo de melhorar a qualidade do diagnóstico da infecção recente pelo HIV e, ao mesmo tempo, fornecer uma base racional para assegurar que o diagnóstico seja seguro e concluído em tempo hábil.

Para construir a base lógica desses fluxogramas, empregamos como referência a classificação de Fiebig, ou seja, um sistema de estagiamento laboratorial da infecção recente pelo HIV. Os ensaios de terceira geração permitiram a detecção de IgM e IgG e representaram um avanço no diagnóstico da infecção recente pelo HIV; porém, novas tecnologias foram desenvolvidas, como por exemplo os testes de quarta geração que possibilitam a detecção combinada de antígeno e anticorpo, permitindo diminuir ainda mais o período de janela diagnóstica do HIV.

Os testes de 3ª e 4ª geração são mais sensíveis do que os testes confirmatórios convencionais (Western blot - WB, Imunoblot - IB, ou Imunoblot Rápido - IBR), tornando fluxogramas com essa composição de ensaios inadequados para a detecção de infecções recentes e de baixo custo-efetividade. Por essa razão, testes moleculares empregados como testes confirmatórios são mais adequados para o diagnóstico de infecções agudas e/ou recentes.

Por outro lado, existem indivíduos, chamados de controladores de elite, que mantêm a viremia em um nível que pode ser indetectável em testes moleculares. Nesses casos, o diagnóstico só pode ser realizado mediante a utilização dos testes confirmatórios WB, IB e IBR citados.

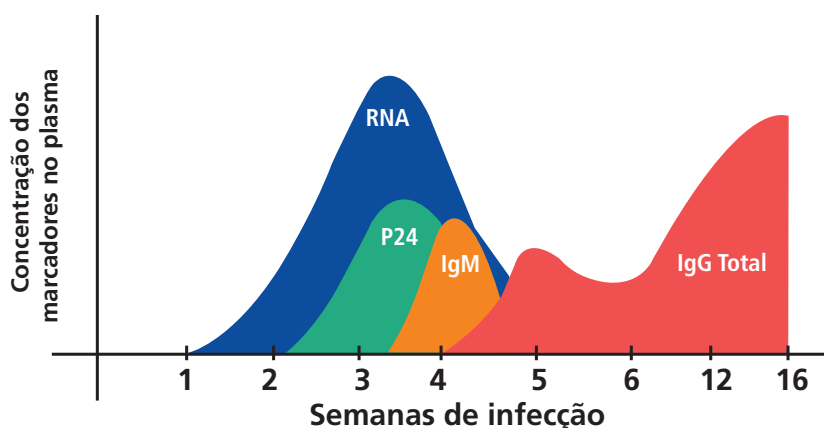
A estimativa do número de indivíduos considerados **controladores de elite**⁶ depende de dois parâmetros: o valor da Carga Viral e o tempo em que o indivíduo permanece com a Carga Viral abaixo (ou igual) a esse valor. Estudos recentes em indivíduos infectados e em doadores de sangue sugerem que a ocorrência de controladores de elite não é superior a 1% dos indivíduos diagnosticados.

É importante observar que, em fluxogramas que utilizam testes moleculares para confirmação, indivíduos controladores de elite e indivíduos não infectados, porém com resultado falso-positivo no teste de triagem, terão resultado igualmente negativo no teste molecular. A distinção entre essas duas situações se dará por meio da realização de testes como o WB ou IB ou IBR.

Diante dessa diversidade de cenários, não é possível a utilização de apenas um fluxograma para cobrir todas as situações que se apresentam para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Assim, casos de infecção recente são melhor identificados com a utilização de um teste de 4ª geração como teste de triagem e um teste molecular como teste confirmatório, enquanto que os controladores de elite são facilmente identificados com IE de 3ª ou 4ª geração e um WB como teste confirmatório.

Indivíduos na fase crônica da infecção são identificados com sucesso com qualquer combinação de testes de triagem (3ª ou 4ª geração), seguido por um teste confirmatório (WB ou teste molecular). Na realidade, esses indivíduos constituem a maioria (>95%) dos casos diagnosticados.

Figura 5 - Marcadores da infecção pelo HIV na corrente sanguínea de acordo com o período que surgem após a infecção, seu desaparecimento ou manutenção ao longo do tempo.



(Fonte: BUTTÒ, S.; SULIGOI, B.; FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Ann. Ist. Super. Sanità*, [S.I.], v. 46, n. 1, p. 24-33, 2010. Adaptado de: HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil Telelab/MS).

A estimativa dos casos de infecção recente ou aguda que se apresentam para o diagnóstico depende da incidência da infecção. Por exemplo, em populações em que a incidência é baixa, o número de casos com infecção recente ou aguda é muito pequeno. O inverso ocorre em populações de risco acrescido, em que a incidência é alta e a probabilidade de casos com infecção recente ou aguda é significativa. Portanto, a escolha do fluxograma deve levar em consideração a população-alvo da testagem, a fim de maximizar as chances de diagnosticar infecções recentes e/ou agudas.

Os testes para detecção da infecção pelo HIV são principalmente empregados em três situações: para triagem sorológica do sangue doado e garantia da segurança do sangue, hemoderivados e órgãos para transplante; para os estudos de vigilância epidemiológica; e para realizar o diagnóstico da infecção pelo HIV.

A seguir, comentamos sobre os principais testes utilizados no diagnóstico da infecção pelo HIV.

4.1. Imunoensaio de triagem

Logo após a descoberta do HIV, foram desenvolvidos **imunoensaios**⁶ (IE) para o diagnóstico da infecção. Nas últimas décadas, quatro gerações de IE foram desenvolvidas. Essas gerações foram definidas de acordo com a evolução das metodologias empregadas, a partir do primeiro ensaio disponível comercialmente, no ano de 1985. As principais características das quatro gerações de IE estão descritas a seguir.

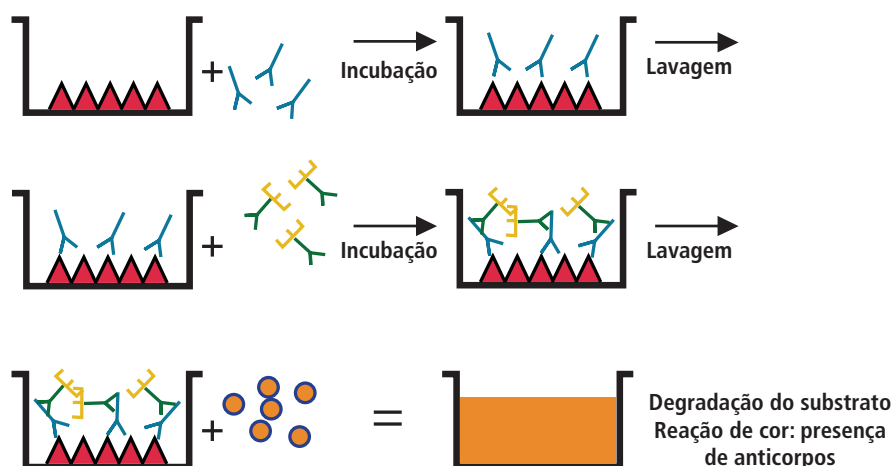
4.1.1. Primeira Geração

O ensaio de primeira geração tem o formato indireto (figura 6), ou seja, a presença de anticorpos específicos é detectada por um conjugado constituído por um anticorpo anti-IgG humana. Na fase sólida, os antígenos são originados de um lisado viral de HIV.

Os antígenos do lisado viral são obtidos a partir de cultura do HIV em linhagens celulares humanas. O vírus é obtido do sobrenadante da cultura, concentrado por centrifugação e lisado para expor as proteínas virais. Essas proteínas são posteriormente purificadas; entretanto, as diferentes proteínas virais não são obtidas com a mesma eficiência e algumas sofrem degradação, alterando as proporções estequiométricas das proteínas presentes no **vírião**⁶. Além disso, proteínas de origem celular e outras impurezas, provenientes do meio de cultura, também podem estar presentes na preparação antigênica final. Dessa forma, o “caldo” constituído por proteínas virais (em proporções distintas daquelas encontradas no vírião), proteínas de células humanas e do meio de cultura, são utilizadas como antígenos na fase sólida do ensaio de primeira geração.

Essas características tornam o ensaio pouco específico e, pelo fato de detectarem apenas IgG, também são menos sensíveis do que os ensaios de gerações posteriores. Em média, a **janela de soroconversão**⁶ dos ensaios de primeira geração é de 6 a 8 semanas. Atualmente, esses ensaios deixaram de ser utilizados na rotina diagnóstica dos laboratórios.

Figura 6 - Ensaio imunoenzimático indireto do tipo ELISA (do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).



Legenda

	Fase sólida Poço de uma placa de 96 poços		Antígeno de HIV (Ag) Ligado à fase sólida - poço da placa
	Anticorpo IgG Anti-HIV (Ac)		Conjugado (Conj) Anti-IgG Humana+ Enzima
			Substrato (S) Cromógeno + H ₂ O ₂

4.1.2. Segunda Geração

O ensaio de segunda geração também tem formato indireto; porém, utiliza antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados de proteínas do HIV. A possibilidade de utilizar antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos no diagnóstico da infecção pelo HIV decorre do conhecimento de que existem regiões antigênicas em determinadas proteínas do HIV - epítomos imunodominantes – que são alvos preferenciais da resposta imune humoral. Quanto maior a quantidade de epítomos imunodominantes no ensaio, mais sensível esse ensaio se torna.

Proteínas fracamente imunodominantes, ou aquelas em que o aparecimento do anticorpo se dá mais tardiamente, não contribuem para melhorar o desempenho do ensaio e ainda podem ser fonte de reatividade inespecífica.

Em comparação com os ensaios de primeira geração, os de segunda geração são mais sensíveis e específicos, por conter uma maior concentração de proteínas (epítomos imunodominantes) relevantes. Em média, a janela de soroconversão dos ensaios de segunda geração é de 28 a 30 dias.

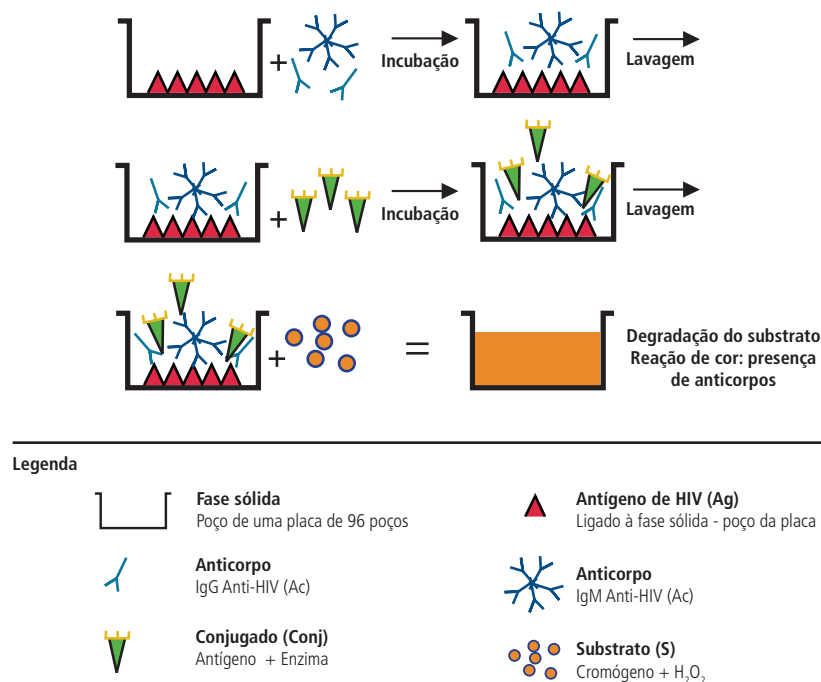
4.1.3. Terceira Geração

O ensaio de terceira geração tem o formato “sanduíche” (ou imunométrico). A característica desse ensaio é utilizar antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos tanto na fase sólida quanto sob a forma de conjugado. Esse formato permite a detecção simultânea de anticorpos anti-HIV IgM e IgG.

Como a IgG é bivalente, ou seja, possui dois sítios de ligação ao antígeno (chamados de região Fab da imunoglobulina) e a IgM é pentavalente, um desses sítios liga-se ao antígeno adsorvido à fase sólida e o(s) outro(s) Fab fica(m) livre(s) para posteriormente ligar-se aos mesmos antígenos solúveis, sob a forma de conjugado. Dessa forma, o anticorpo fica “entre dois” antígenos e, por essa característica, qualquer classe de imunoglobulina anti-HIV (IgG, IgM, IgA ou IgE) será detectada por esse tipo de metodologia.

A possibilidade de detectar anticorpos da classe IgM torna esse ensaio mais sensível do que os de gerações anteriores. Ao mesmo tempo, há aumento da especificidade, pois o conjugado (antígenos) liga-se apenas à valência livre do anticorpo que está no complexo imune (antígenos na fase sólida do ensaio e anticorpos da amostra). Em média, a janela de soroconversão dos ensaios de terceira geração é de 22 a 25 dias. A figura 7 mostra uma representação esquemática de um ensaio de terceira geração.

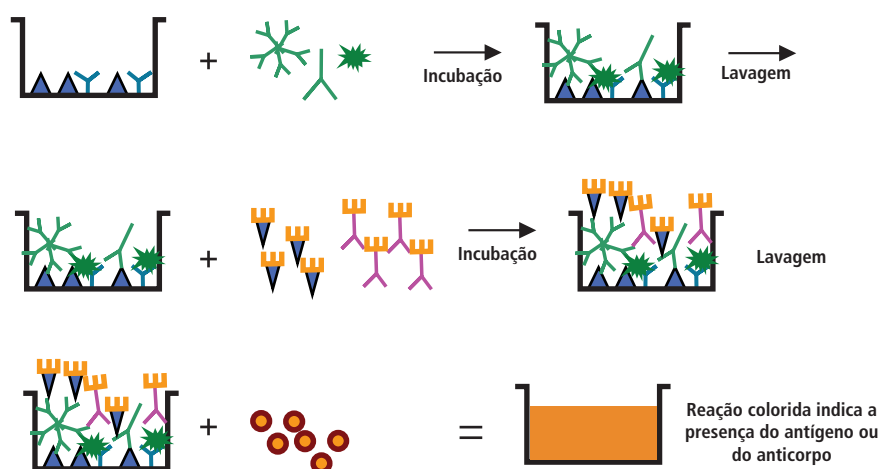
Figura 7 - Ensaio imunoenzimático “sanduíche” ou imunométrico de terceira geração do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).



4.1.4. Quarta Geração

O ensaio de quarta geração detecta simultaneamente o antígeno p24 e anticorpos específicos anti-HIV. O componente de detecção de anticorpo tem o formato de “sanduíche”; portanto, detecta todas as classes de imunoglobulinas contra proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados das glicoproteínas gp41 e gp120/160. O componente de detecção de antígeno p24 é constituído por um anticorpo monoclonal na fase sólida (para capturar o antígeno p24 presente no soro) e de um conjugado constituído por um antissoro (anticorpo) poliespecífico contra a proteína p24. Em média, a janela diagnóstica dos ensaios de quarta geração é de aproximadamente 15 dias, dependendo do ensaio utilizado. A figura 8 mostra uma representação esquemática de um teste de quarta geração.

Figura 8 - Ensaio imunoenzimático sanduíche ou imunométrico de quarta geração do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).



Legenda

	Fase sólida Poço de uma placa de 96 poços		Anticorpo IgG Anti-HIV (AC) Presente na amostra do indivíduo
	Anticorpo Anti-P24 Ligado à fase sólida – poço da placa		Proteína P24 do HIV Presente na amostra do indivíduo
	Antígeno de HIV (Ag) Ligado à fase sólida - poço da placa		Conjugado (Conj) Antígeno + enzima
	Anticorpo IgM Anti-HIV (AC) Presente na amostra do indivíduo		Substrato (S) Cromógeno + H ₂ O ₂
	Conjugado (Conj) Anticorpo Anti-P24 + enzima		

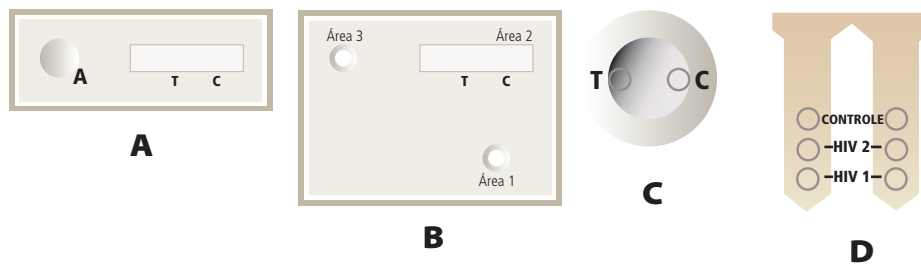
Neste manual, as gerações de imunoenaios estão representadas como testes imunoenzimáticos⁶ do tipo ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) porque os primeiros testes que surgiram no mercado, de primeira geração, usavam essa metodologia.

Atualmente, outras metodologias estão disponíveis. Para conhecê-las ou revisá-las, faça o curso “HIV-Estratégias para Diagnóstico no Brasil”, da Série Telelab do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, disponível em www.telelab.aids.gov.br

4.2. Testes Rápidos (TR)

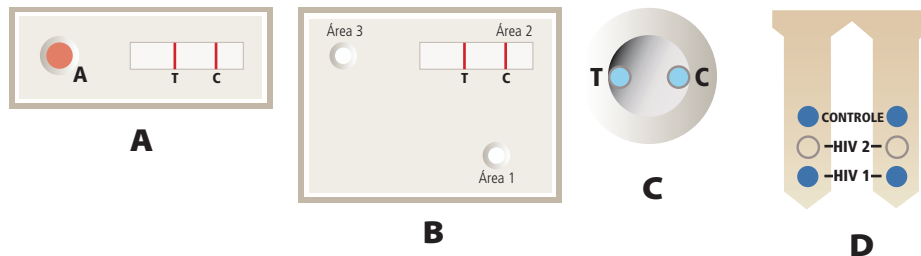
Os Testes Rápidos (TR) são imunoenaios (IE) simples, que podem ser realizados em até 30 minutos. Por essas características, serão tratados neste Manual pela denominação de Testes Rápidos. Como consequência do desenvolvimento e da disponibilidade de testes rápidos, o diagnóstico do HIV atualmente pode ser realizado em ambientes laboratoriais e não laboratoriais, permitindo ampliar o acesso ao diagnóstico. Existem vários formatos de TR, e os mais frequentemente utilizados são: dispositivos (ou tiras) de Imunocromatografia (ou fluxo lateral), Imunocromatografia de dupla migração (DPP), dispositivos de imunoconcentração e fase sólida (figuras 9, 10 e 11).

Figura 9 - Exemplos de Testes Rápidos (TR) para HIV, (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida.



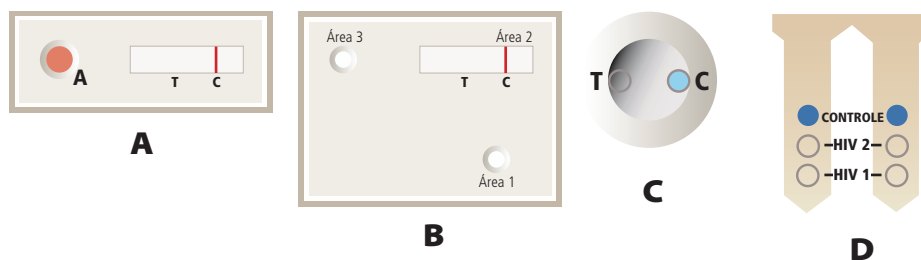
(Adaptado de: HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS)

Figura 10 - Exemplos de Testes Rápidos Reagentes (TR) para HIV. Observa-se presença de linha ou ponto na área T (Teste) e na área C (Controle), (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida.



(Adaptado de: HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS)

Figura 11 - Exemplos de Testes Rápidos Não Reagentes (TR) para HIV. Observa-se presença de linha ou ponto apenas na área C (Controle), (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida.



(Adaptado de: HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS)

Tendo em vista que os TR são desenvolvidos para detectar anticorpos anti-HIV em até 30 minutos, em comparação com o IE, que pode levar até 4 horas, os dispositivos são otimizados para acelerar a interação antígeno/anticorpo. Isso requer a utilização de uma maior concentração de antígeno e da detecção de complexo antígeno/anticorpo com reagentes sensíveis à cor, como, por exemplo, o ouro coloidal. Os testes rápidos são ideais para fornecer resultados no mesmo dia em uma variedade de situações e locais descritos no item 4.2.1.

4.2.1. Situações e locais nas quais o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais recomenda a utilização de Testes Rápidos:

- a) Rede de serviços de saúde sem infraestrutura laboratorial ou localizada em regiões de difícil acesso;
- b) Programas do Ministério da Saúde, tais como Rede Cegonha, Programa de Saúde da Família, Consultório na Rua, Quero Fazer, dentre outros programas;
- c) Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA e Unidade de Testagem Móvel;
- d) Segmentos populacionais flutuantes;
- e) Segmentos populacionais mais vulneráveis;
- f) Parcerias de pessoas vivendo com HIV/aids;
- g) Acidentes biológicos ocupacionais;
- h) Gestantes no pré-natal e que não tenham sido testadas durante o pré-natal ou cuja idade gestacional não assegure o recebimento do resultado do teste antes do parto;
- i) Parturientes e puérperas que não tenham sido testadas no pré-natal ou quando não é conhecido o resultado do teste no momento do parto;
- j) Abortamento espontâneo, independentemente da idade gestacional;
- k) Laboratórios que realizam pequenas rotinas (rotinas com até 5 amostras diárias para diagnóstico da infecção pelo HIV);
- l) Pessoas em situação de violência sexual como prevenção das DST/aids;
- m) Pacientes atendidos em pronto-socorros;
- n) Outras situações especiais definidas pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV) para ações de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis e **Síndrome da Imunodeficiência Adquirida**⁶.

Testes rápidos são primariamente recomendados para testagens presenciais. Podem ser realizados com fluido oral, soro, plasma ou sangue total (o que permite o uso de amostras obtidas por punção digital). Os testes rápidos são simples de executar e podem ser utilizados fora do ambiente de laboratório por pessoal capacitado. Com o objetivo de ampliar o acesso ao diagnóstico do HIV no Brasil e habilitar o maior número de profissionais de saúde para realizar esses testes, o DDAHV oferece modelos de treinamento presencial ou à distância (Sistema TELELAB, disponível em www.telelab.aids.gov.br), que aborda vários aspectos relativos à qualidade, segurança e execução do TR.

Diversos TR estão disponíveis comercialmente; porém, nem todos possuem as características de desempenho, de sensibilidade e de especificidade estabelecidas pelo DDAHV neste Manual. Para evitar o emprego de TR com desempenho sub-ótimos, o DDAHV tem um programa para avaliação da qualidade dos TR (Tabelas 2 e 3). Os resultados dessas avaliações são publicados periodicamente no site www.aids.gov.br.

Tabela 2 – Características de desempenho de sensibilidade e especificidade dos Testes Rápidos para HIV estabelecidas pelo DDAHV a partir de 2013.

Parâmetro	Critério
Especificidade Clínica	> 99,0%
Sensibilidade Clínica	> 99,5%
Desempenho operacional do ensaio (DOE)	Desempenho “satisfatório” (4 pontos de 5 possíveis)

Tabela 3 – Parâmetros de desempenho e critérios de pontuação dos Testes Rápidos para HIV estabelecidos pelo DDAHV.

Parâmetro do DOE	Desempenho desejado Pontuação = 1	Desempenho não desejado Pontuação = 0
Nº de reagentes necessários	Apenas 1 reagente	Mais de 1 reagente
Temperatura de armazenamento dos reagentes	Inclui temp. ambiente	2° C a 8° C requeridos
Total de etapas	Máximo de 4	Mais do que 4
Tempo total de realização	Máximo de 30 minutos	Mais de 30 minutos
Habilidades técnicas requeridas	Sem conhecimento laboratorial	Experiência laboratorial requerida

Outros testes rápidos foram desenvolvidos utilizando o fluido oral (FO) como amostra, coletada por meio de um dispositivo específico. O FO contém uma menor quantidade de IgG do que amostras de sangue, mas, em quantidade ainda suficiente para permitir o diagnóstico seguro da infecção pelo HIV. Os anticorpos presentes no FO são transferidos passivamente do sangue circulante para o fluido gengival (chamado de fluido crevicular). Por essa razão, os anticorpos da classe IgG presentes no FO possuem toda gama de especificidades dos anticorpos presentes no soro.

O emprego do FO pode simplificar ainda mais a testagem de HIV, tornando-a mais acessível, além de reduzir o risco biológico associado aos testes baseados em sangue. Entretanto, a sensibilidade e a especificidade dos ensaios que utilizam o fluido oral são inferiores aos ensaios que utilizam amostras de sangue, soro ou plasma. É importante ressaltar que a janela de soroconversão dos testes rápidos que utilizam o fluido oral pode chegar até a três (3) meses, dependendo do conjunto diagnóstico utilizado.

4.3. Ensaios Complementares

Embora os testes rápidos e os IE sejam sensíveis e específicos, resultados falso-positivos podem ocorrer; por essa razão, os **testes complementares**⁶ foram desenvolvidos. Os testes complementares utilizam diferentes formatos e princípios. Estão incluídos nessa categoria: Western blot (WB), Imunoblot (IB) ou imunoenaios em linha (LIA, do inglês *Line Immuno Assay*), incluindo o Imunoblot Rápido (IBR) e imunofluorescência indireta (IFI). A IFI foi muito utilizada como teste complementar durante a primeira década da epidemia de HIV, mas atualmente foi substituída pelo WB e Imunoblot. O WB e o Imunoblot envolvem o uso de tiras de membrana com proteínas nativas do HIV que são separadas por eletroforese (WB), ou por proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos impregnados diretamente nessas membranas (Imunoblot). Essas tiras são incubadas com amostras de soro ou plasma. Os anticorpos presentes na amostra se ligam especificamente às proteínas das tiras de WB ou IB e esses anticorpos anti-HIV específicos ligados às proteínas são detectados por anticorpos secundários, conjugados com uma enzima, seguido por um substrato que gera um produto colorido. O WB e o Imunoblot são de custo elevado e requerem interpretação subjetiva para estabelecer um diagnóstico com base em um padrão de

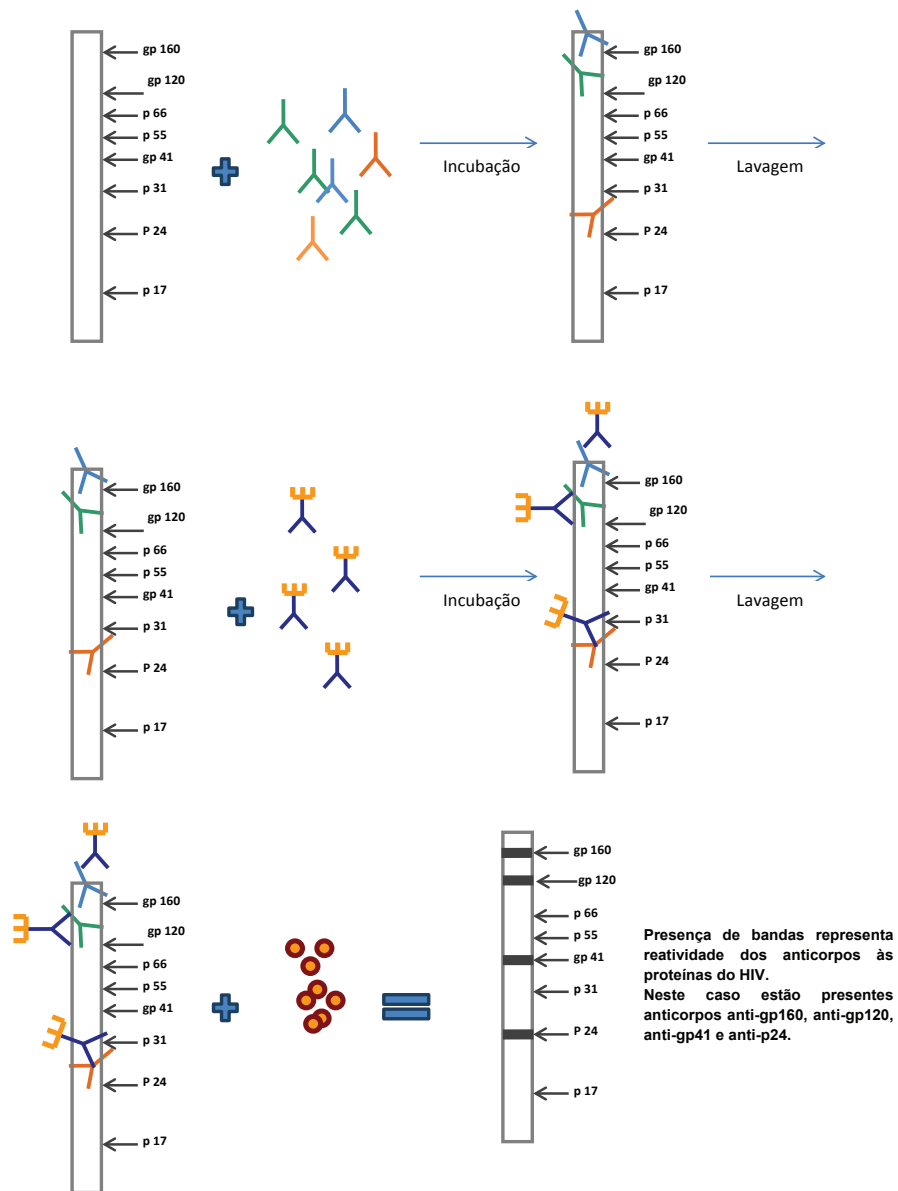
reatividade definido pelo fabricante do conjunto diagnóstico. O DDAHV define o padrão mínimo aceitável de interpretação do WB como reagente (presença de bandas), em pelo menos duas das seguintes proteínas: p24; gp41; gp120/gp160.

O IBR é semelhante ao IB, porém utiliza a metodologia DPP (Plataforma de Migração Dupla). Na fase sólida estão presentes os antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos dos vírus HIV-1 (p24, gp41, gp120 e gp160), incluindo o grupo O, e também a proteína do HIV-2 (gp36). Ao contrário do WB e IB, o IBR permite a detecção de anticorpos em menos de 30 minutos.

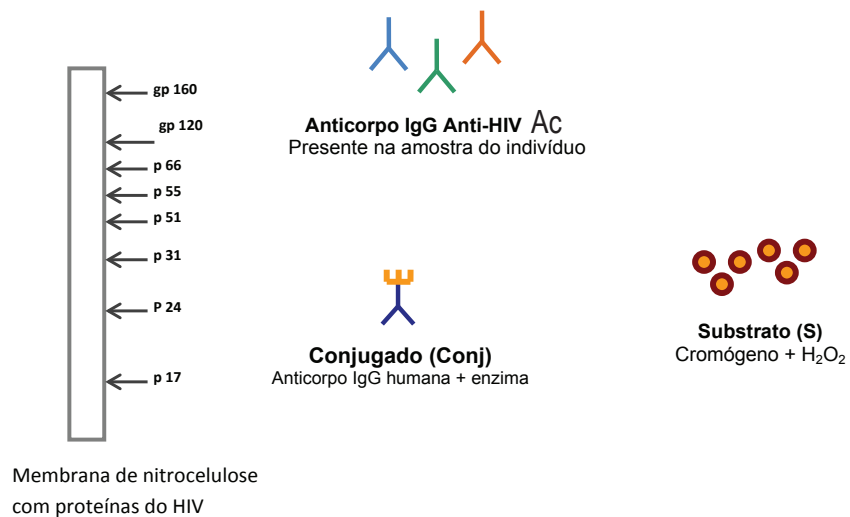
A maioria desses ensaios detectam apenas IgG e por isso não são recomendados para confirmar a presença de anticorpos IgM HIV específicos (ensaios de terceira ou quarta geração) ou a presença do antígeno p24 (ensaios de quarta geração).

O DDAHV define o padrão mínimo aceitável de interpretação do WB como reagente quando é detectada a presença de pelo menos duas das seguintes proteínas: p24; gp41; gp120/gp160.

Figura 12 - Reação de Western blot.



Legenda



4.4. Diagnóstico por detecção direta do HIV

A infecção pelo HIV pode ser diagnosticada por meio da detecção direta de componentes do vírus (antígeno p24, RNA ou DNA pró-viral). A detecção do antígeno p24 do HIV-1 ou de RNA ou DNA desempenha um papel importante quando a detecção de anticorpos não é possível. São especialmente úteis para o diagnóstico em crianças com idade inferior a 18 meses e na infecção aguda em adultos. A detecção molecular de ácido nucleico é mais sensível do que a detecção de p24.

Dependendo da fase da infecção, o HIV pode ser encontrado principalmente como DNA pró-viral em células infectadas ou como RNA no sangue (como componente da partícula viral livre ou RNA intracelular). Existem testes comerciais que detectam o DNA (qualitativo) e/ou RNA, quer qualitativamente ou quantitativamente. A detecção de infecção aguda por testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) é principalmente utilizada na triagem de doadores de sangue, com o objetivo de aumentar a segurança do sangue e de hemoderivados. É importante registrar que a maioria dos indivíduos com infecção aguda apresentam Carga Viral elevada e, conseqüentemente, têm maior risco de transmitir a infecção aos seus parceiros.

Outra aplicação importante para os testes moleculares é o diagnóstico precoce da infecção pelo HIV em crianças com exposição perinatal. Crianças nascidas de mães soropositivas adquirem anticorpos anti-HIV passivamente, e dessa forma ensaios baseados em anticorpos não podem ser utilizados para confirmar ou descartar a infecção pelo HIV (ver capítulo 9).

4.5. Diagnóstico utilizando amostras de sangue seco em papel filtro

As amostras de sangue seco em papel filtro (do inglês, *dried blood spots, DBS*) oferecem uma alternativa simples e fácil como amostra para sorologia e testes moleculares para HIV. Existem IE e WB que foram otimizados para utilizar DBS como amostra. O armazenamento e o transporte do DBS devem ser realizados conforme instruções de uso do conjunto diagnóstico. As amostras coletadas em papel filtro devem ser testadas apenas com conjuntos diagnósticos que possuem registros válidos na ANVISA para utilização nesse tipo de amostra.

5. SISTEMA DE ESTAGIAMENTO LABORATORIAL DA INFECÇÃO RECENTE PELO HIV: CLASSIFICAÇÃO DE FIEBIG

5.1. Estágios da infecção recente

Uma compreensão detalhada do tempo de curso da viremia e da soroconversão durante a infecção primária pelo HIV é pré-requisito importante para entender e aperfeiçoar fluxogramas diagnósticos. Nesse sentido, Fiebig e colaboradores (2003) propuseram um sistema de estagiamento laboratorial da infecção recente pelo HIV-1 que inclui também projeções da duração de cada estágio, com base no padrão de reatividade de diferentes ensaios – RNA viral, antígeno p24, IE de terceira geração e Western blot.

Uma primeira observação importante é a de que a reatividade dos diferentes tipos de ensaios para a detecção da infecção pelo HIV progride sequencialmente e permite que a cada aparecimento de um marcador na circulação, seja atribuído um estágio à infecção. Assim, cada um dos seis estágios é definido por um padrão único de reatividade a um ou mais ensaios.

Esse sistema classifica em detalhes as fases iniciais da infecção e facilita o entendimento de qual teste ou fluxograma é mais indicado para fazer o diagnóstico da infecção pelo HIV em diferentes situações. Segue a descrição de cada um destes estágios (Tabela 4):

Tabela 4 – Classificação de Fiebig para Estagiamento Laboratorial da Infecção pelo HIV.

Estágio	Marcador				Duração em dias (IC 95%)	
	RNA	p24 Ag	IE (3aG)	WB	Individual	Cumulativo
0	-	-	-	-	10 (7-21)	10
I	+	-	-	-	7 (5-10)	17
II	+	+	-	-	5 (4-4)	22
III	+	+	+	-	3(2-5)	25
IV	+	+/-	+	Ind	6 (4-8)	31
V	+	+/-	+	+(-p31c)	70 (40-122)	101
VI	+	+/-	+	+(+p31)	Sem limite de duração	Sem limite de duração

Cohen et al. J. Infect. Dis. 2010, 202 (S2): S270-S277

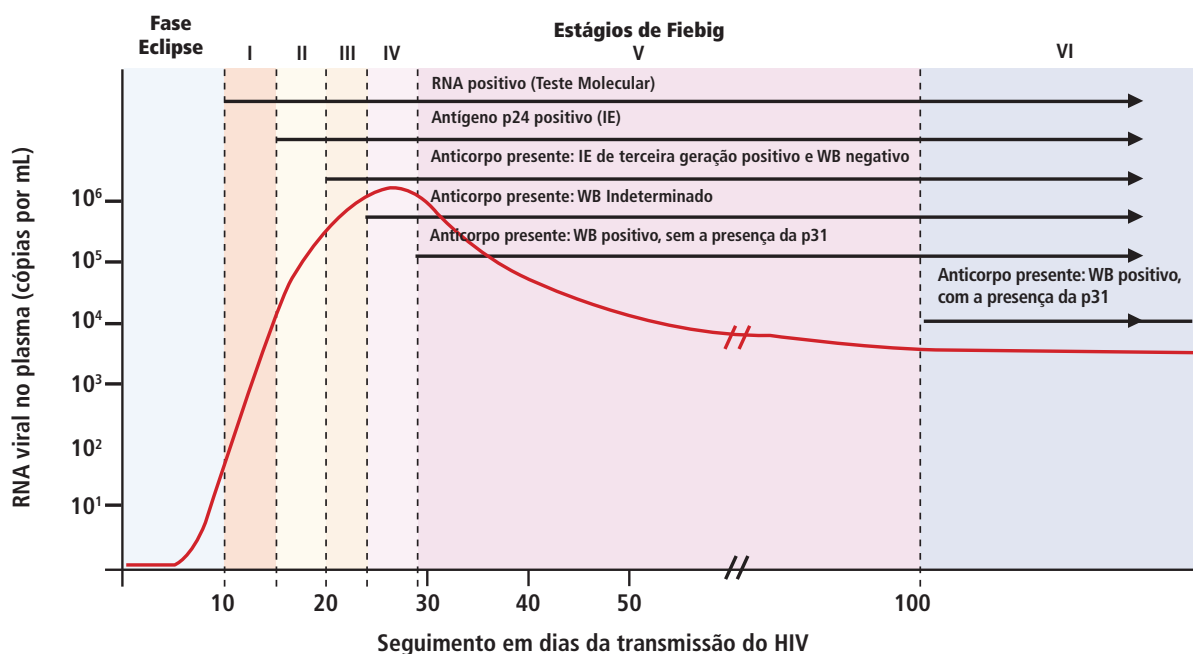
- Estágio 0 (ou período de eclipse): é caracterizado pela ausência de marcadores virais em amostras de sangue. Esse período tem uma duração média de 10 dias, a partir da infecção até a primeira detecção de RNA viral;
- Estágio I: o RNA viral é consistentemente detectável em amostras de sangue e nenhum outro ensaio laboratorial é positivo. A duração média desse estágio é de 5 dias;
- Estágio II: os testes para RNA viral e antígeno p24 são positivos, mas os anticorpos estão ausentes (não reagente) no IE. A duração média desse estágio é de 5,3 dias;
- Estágio III: RNA, antígeno p24 e IE de terceira geração (sensíveis à detecção de IgM anti-HIV) são reagentes, mas o Western blot não mostra bandas específicas do HIV-1. Esse estágio é o mais curto e tem duração média de 3,2 dias;
- Estágio IV: como o estágio III, mas com padrão indeterminado no Western blot, ou seja, a presença de bandas específicas de HIV-1, mas que não preenchem os critérios de interpretação de WB positivo, que é definido pela presença de duas de três bandas seguintes: p24, gp41 ou gp120/160. A duração média é de 5,6 dias;
- Estágio V: como o estágio IV, mas com padrão positivo de Western blot, exceto pela ausência de reatividade da proteína p31 (pol). Esse estágio é mais longo e o tempo médio até o aparecimento da p31 é de 69,5 dias;
- Estágio VI: como o estágio V, mas com o padrão de reatividade do Western blot completo, incluindo a banda p31. A duração desse estágio não é definida; no entanto, ele pode ser subdividido em dois períodos de infecção: recente e crônica. Essa subdivisão é

baseada em testes laboratoriais que exploram certas características dos anticorpos anti-HIV, como quantidade (concentração), avides e proporção. Dependendo do teste utilizado, a infecção recente tem duração de 120 a 180 dias após a infecção.

Os testes de quarta geração e os TR não foram incluídos na classificação de Fiebig, mas estudos posteriores demonstraram que os testes de quarta geração podem detectar amostras do estágio II ou III, dependendo do fabricante do teste. Da mesma forma, os TR de terceira geração podem detectar amostras no estágio II, III ou IV, dependendo do fabricante do TR.

Para os TR que utilizam fluido oral, não é possível determinar em que estágio da classificação de Fiebig eles se encaixam, pois não existem painéis com amostras de FO de indivíduos em soroconversão para esse tipo de avaliação.

Figura 13 - Estágios da infecção recente pelo HIV-1. A análise de amostras de indivíduos recentemente infectados pelo HIV-1 revelou que as primeiras semanas após a infecção podem ser divididas em estágios com base no padrão de reatividade de diferentes ensaios laboratoriais.



(Modificado de: MCMICHAEL, A.; BORROW, P.; TOMARAS, G. D. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev.*, [S.l.], v. 10, p. 11-23, 2010).

5.2. Limitações do modelo de Fiebig

Esse modelo fornece estimativas para períodos de janelas diagnósticas tendo como referência testes habitualmente utilizados no diagnóstico do HIV-1. Esse sistema de estagiamento tem aplicação direta para fins de diagnóstico, especialmente na construção de fluxogramas para o diagnóstico da infecção pelo HIV nas fases aguda, recente e crônica; porém, apresenta limitações.

A primeira limitação, inerente à proposta de estagiamento laboratorial da infecção pelo HIV, é a dependência da atribuição de um determinado estágio à sensibilidade do ensaio. Como a sensibilidade de qualquer categoria de ensaio depende do fabricante, é possível que os resultados de determinados ensaios classifiquem a infecção em estágios diferentes. A segunda limitação é que os pacientes geralmente se apresentam para o diagnóstico após a soroconversão e a curta duração dos estágios I a IV limita seu uso. A terceira é que, embora raros, existem indivíduos nos quais a soroconversão tem curso prolongado, que pode durar entre três e seis meses. Quarta; os dados desse modelo foram derivados de doadores de plasma que continuaram a se apresentar para a doação, e conseqüentemente podem representar um grupo de indivíduos infectados sem sintomas agudos ou com sintomas mais brandos. Portanto, pacientes que apresentam sintomatologia mais pronunciada da síndrome retroviral podem ter níveis mais elevados de viremia e diferente ritmo de progressão da soroconversão, em comparação com os doadores de plasma.

Finalmente, uma limitação dessa classificação deve-se à utilização, no estudo, de ensaios sorológicos desenvolvidos unicamente com proteínas do subtipo B do HIV-1. Devido às variações de sequências entre os diferentes subtipos do HIV-1, é possível que o reconhecimento de proteínas do subtipo B por anticorpos de indivíduos infectados por outro subtipo resulte em um estagiamento diferente.

Com essas ressalvas, o sistema de estagiamento laboratorial proposto fornece um quadro de referência para saber quanto tempo esperar até que os marcadores virais tornem-se positivos durante a infecção recente pelo HIV.

6. FALHAS E ERROS NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV

O diagnóstico da infecção pelo HIV é suscetível de falhas e erros. Com exceção do período de janela diagnóstica, anteriormente discutido neste Manual, existem outras causas de falhas que podem excepcionalmente ocorrer quando se realiza o diagnóstico da infecção pelo HIV. A primeira é a ocorrência de infecções causadas por cepas virais com variações genéticas que não são detectadas pelos testes em uso corrente. Citamos, como exemplo, as modificações que foram feitas ao longo dos anos em testes sorológicos para incluir antígenos do HIV-2 e do HIV-1 do grupo "O" (do inglês, *outlier*), que anteriormente não eram detectados pelos testes disponíveis no mercado. O pronto reconhecimento dessas cepas pela comunidade científica e a rápida resposta dos fabricantes no desenvolvimento de novos testes mais sensíveis e específicos são decisivos nesses momentos.

A segunda causa é a existência de indivíduos "imunossilenciosos"⁶ (do inglês, *immunosilents*) que possuem níveis baixos ou mesmo ausência de anticorpos específicos e, dessa forma, não são detectados nos testes sorológicos. Excetuando-se indivíduos com outras causas de imunodeficiência, a ocorrência desses casos é muito rara, tornando esse tipo de falha desprezível no contexto de saúde coletiva. Outra exceção são os indivíduos que cursam a infecção sem viremia, ou com viremia muito baixa, denominados de Controladores de Elite (do inglês, *elite controllers*) e, devido a isso, podem não ser detectados pelos testes moleculares. Esses indivíduos, no entanto, possuem resposta imune humoral intacta e não oferecem risco de não serem detectados quando submetidos a testes sorológicos.

Já os erros que ocorrem durante o processo de execução dos testes laboratoriais e suas causas são de origem humana ou operacional. Estima-se que seja na fase pré-analítica que ocorram aproximadamente 60-70% dos erros laboratoriais. Assim sendo, a adoção de boas práticas laboratoriais contribui para minimizar tais erros, melhorando a qualidade da amostra a ser testada. Esses erros incluem a falta de calibração ou de manutenção dos equipamentos, a troca de amostras e a utilização de volumes (de amostra ou de reagentes) distintos do preconizado pelo fabricante do conjunto diagnóstico. No ato da coleta, a utilização de etiquetas com código de barras para a identificação das amostras, o uso dos tubos primários na testagem, a automação dos testes, a adoção de um programa de qualidade e/ou de boas práticas de laboratório, assim como a participação sistemática em programas de Avaliação Externa da Qualidade - AEQ, são fatores importantes na redução do erro no processo de testagem.

7. TECNOVIGILÂNCIA

A Tecnovigilância, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, do Ministério da Saúde – MS, tem por objetivo monitorar a segurança sanitária de produtos para saúde pós-comercialização (equipamentos, materiais, artigos médico-hospitalares, implantes e produtos para diagnóstico de uso “in-vitro”). Consiste em um sistema de vigilância de eventos adversos (EA) e queixas técnicas (QT) de produtos para a saúde na fase de pós-comercialização, e recomenda a adoção de medidas que garantam a proteção e a promoção da saúde da população. Considera-se EA aquele evento que causou dano à saúde de um usuário. Se, até o momento da notificação, o problema observado no produto ainda não tiver causado nenhum dano à saúde, este deverá ser notificado como queixa técnica (QT).

O objetivo principal da Tecnovigilância é monitorar e, quando apropriado, verificar a segurança e o desempenho de produtos para a saúde no período de pós-comercialização, com vistas a identificar eventos e desvios da qualidade que produzem ou potencialmente podem produzir resultados inesperados ou indesejáveis, que afetam a segurança do paciente. Outro objetivo importante é a coordenação nacional dessas atividades. As diversas competências dessa área da ANVISA/MS estão descritas pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, atualizada pela Portaria nº 406, de 14 de outubro de 2005.

Os EA e as QT de produtos para a saúde, na fase de pós-comercialização, podem ser notificados à Tecnovigilância/ANVISA/MS pelo NOTIVISA. Trata-se de um sistema informatizado na plataforma web, previsto pela Portaria nº 1.660, de 22 de julho de 2009, do Ministério da Saúde.

Podem utilizar o NOTIVISA os profissionais de serviços de saúde, ANVISA, Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais, Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, Laboratórios de Saúde Pública, Universidades/Centros de Pesquisa, além dos profissionais que atuam em drogarias e farmácias e em empresas detentoras de registro de produtos sob vigilância sanitária (fabricantes, importadores e distribuidores) e os profissionais de saúde liberais. Para acessar o Sistema, é preciso se cadastrar de acordo com a categoria do notificante. Por exemplo, profissional liberal deve se cadastrar como Profissional de Saúde, mas se for um profissional vinculado a alguma instituição/empresa, deve ser providenciado o cadastro institucional. Os cidadãos poderão notificar EA e QT por meio dos formulários próprios de notificação.

O sistema tecnovigilância da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA está disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/apresenta.htm> e a notificação avulsa em: <http://www.anvisa.gov.br/sistec/notificacaoavulsa/notificacaoavulsa1.asp>

8. FLUXOGRAMAS DE TESTAGEM PARA HIV

Desde o início da epidemia do HIV, o diagnóstico sorológico da infecção é realizado com pelo menos dois testes, um para triagem e um segundo, mais específico, para confirmar o resultado da triagem. A combinação mais utilizada, habitualmente denominada de **padrão-ouro**⁶, era realizada por meio de um IE de triagem seguido pelo Western blot (WB), como teste confirmatório.

Dois ou mais testes combinados, formando um fluxograma, têm o objetivo de aumentar o **valor preditivo positivo (VPP)**⁶ de um resultado reagente no **teste inicial**⁶. Na maioria das situações, o fluxograma mais comumente utilizado inclui o emprego de testes em série ou sequenciais (fluxograma em série).

O resultado não reagente é liberado com base em um único teste - entretanto, caso persista a suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta da primeira amostra.

O resultado reagente sempre é confirmado com um segundo teste diferente. Com base na especificidade dos testes de triagem, dois resultados reagentes são utilizados para o diagnóstico da infecção. É importante ressaltar que todos os indivíduos recém-diagnosticados devem realizar o exame de quantificação da Carga Viral - CV que, na realidade, compõe um terceiro teste e cujo resultado ratifica a presença da infecção no indivíduo.

O fluxograma em série é lógico e custo-efetivo. O primeiro teste deve ser sempre o mais sensível, seguido por um segundo teste mais específico, a fim de eliminar resultados falso-positivos. No caso de resultados discordantes, os testes devem ser repetidos e, permanecendo a discordância, o indivíduo deve ser testado em uma data posterior - para confirmar ou descartar a soroconversão recente. Finalmente, é importante selecionar a correta combinação de testes para garantir o diagnóstico preciso.

O constante aperfeiçoamento dos ensaios de laboratório e a conseqüente elevação da sensibilidade dos testes de triagem fez com que os **testes confirmatórios**⁶ anteriormente utilizados não sejam mais adequados para confirmar a infecção em um indivíduo com infecção recente pelo HIV. Ainda cabe destacar o surgimento de ensaios que permitem a utilização de outros fluidos corporais, como, por exemplo, o fluido oral, e que oferecem importante alternativa para a ampliação do diagnóstico da infecção pelo HIV.

Por outro lado, ao definirmos o fluxograma como "um método para resolver um problema utilizando um número definido de etapas", fica claro que mais de um fluxograma será necessário para cobrir todas as necessidades de triagem e confirmação da infecção pelo HIV nas diferentes configurações de testes e perfis de pacientes que esse diagnóstico requer. Apresentamos a seguir cinco (5) fluxogramas de testagem para HIV, considerando diversas situações nas quais se faz necessária a realização do diagnóstico da infecção, e fornecemos explicações para fundamentá-los.

Os fluxogramas de números 1, 2 e 3 são os preferenciais por combinarem os testes mais modernos, os quais permitem agilizar o diagnóstico da infecção, sendo também os que apresentam melhor custo-efetividade. Por esses motivos, o DDAHV os indica como sendo os de primeira escolha nas situações em que está recomendada sua aplicação.

8.1. Estratégias para o diagnóstico da infecção pelo HIV empregando Testes Rápidos

Em termos gerais, o **teste rápido**⁶ (TR) refere-se ao teste de HIV realizado em local que permite fornecer o resultado durante o período da visita do indivíduo (consulta médica, atendimento em Centro de Testagem e Aconselhamento - CTA, atendimento em domicílio, atendimento em unidade de testagem móvel, organização não governamental etc.). Uma vez diagnosticado como portador da infecção pelo HIV, o indivíduo deve ser encaminhado prontamente para atendimento em uma Unidade Básica de Saúde (UBS) do SUS ou para um Serviço de Assistência Especializada (SAE).

É importante ressaltar que a sensibilidade de um determinado fluxograma para o diagnóstico da infecção pelo HIV é igual à sensibilidade do primeiro ensaio utilizado no fluxograma. Por isso, deve-se observar que nenhum dos fluxogramas que emprega TR melhora a sensibilidade do diagnóstico da infecção pelo HIV, em comparação com os fluxogramas que utilizam testes convencionais

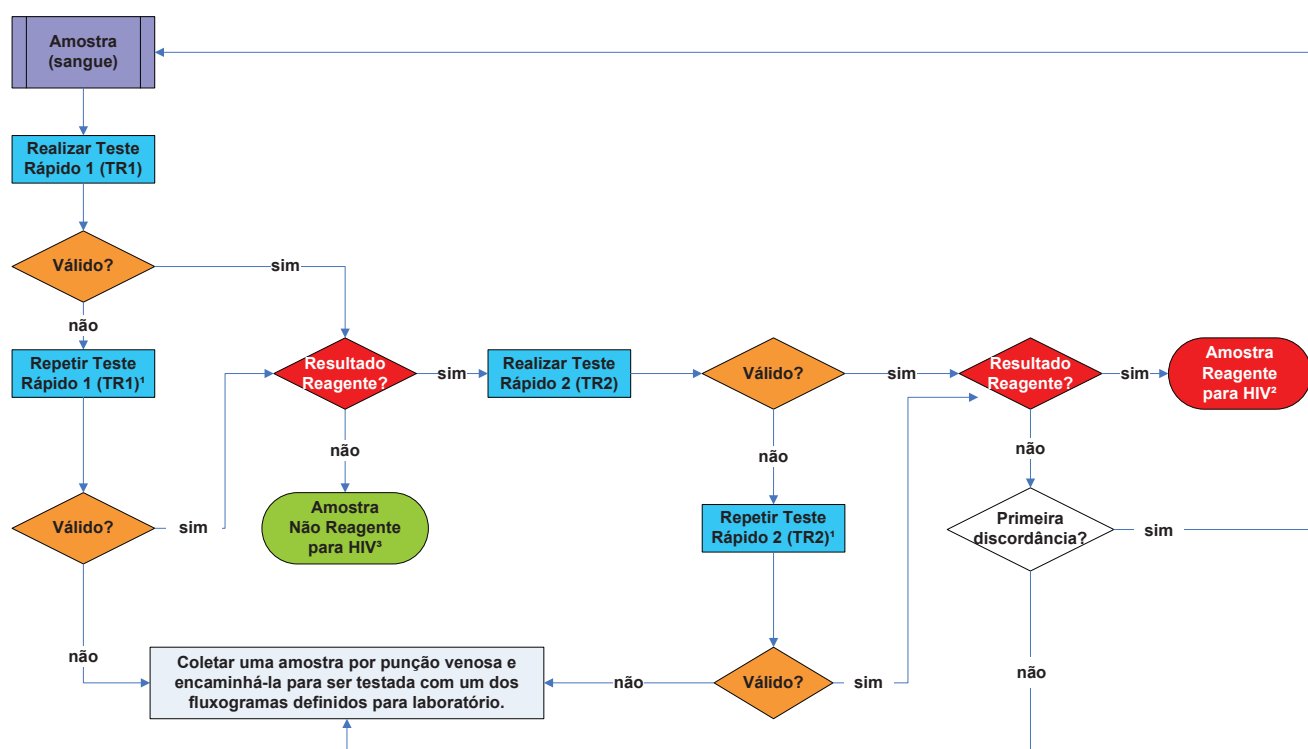
equivalentes nas etapas Fiebig, e que cada estratégia terá a sensibilidade do primeiro teste utilizado no fluxograma. O emprego de fluxogramas com TR amplia o acesso ao diagnóstico e permite a antecipação do início do tratamento, preservando, dessa forma, o sistema imunológico do indivíduo infectado e reduzindo a transmissão, em concordância com a estratégia TasP (do inglês, *Treatment as Prevention*), adotada como política nacional para o enfrentamento da epidemia pelo DDAHV.

Fluxograma 1

Dois testes rápidos (TR1 e TR2) realizados em sequência com amostras de sangue.

Dois testes rápidos diferentes são usados sequencialmente, com amostras de sangue, com o objetivo de melhorar o valor preditivo positivo do fluxograma de testagem. A amostra de sangue pode ser obtida por punção da polpa digital ou por punção venosa em tubo contendo anticoagulante. Esse fluxograma é indicado para ser aplicado nas situações definidas no item 4.2.1 - **Situações e locais nas quais o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais recomenda a utilização de Testes Rápidos**. Além de sangue total, a maioria dos TR permite a utilização de soro ou plasma como amostra para a realização do teste. Leia atentamente as bulas/instruções/guia de uso do produto, que acompanham todos os conjuntos diagnósticos, antes de selecionar a amostra a ser testada.

Figura 14 - Fluxograma 1: TR1 + TR2: sequencial. TR-1 e TR-2 de fabricantes diferentes.



¹ Utilizar um conjunto diagnóstico do mesmo fabricante, preferencialmente de lote de fabricação diferente.

² Encaminhar o paciente para realizar o teste de Quantificação de Carga Viral (RNA HIV-1).

³ Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra.

Legenda:



Processo predefinido.



Processo.



Exige uma tomada de decisão.



Finalizador.

Este fluxograma é indicado para ser utilizado nas situações descritas no item 4.2.1.

Fundamentação

No Fluxograma 1, dois testes rápidos são utilizados sequencialmente, ambos com amostras de sangue, com o objetivo de melhorar o valor preditivo positivo desse fluxograma. É importante que o primeiro TR (TR1) tenha sensibilidade equivalente ou superior ao segundo teste (TR2). O objetivo dessa estratégia é diferenciar os indivíduos que estão infectados (ambos TR1 e TR2 reagentes) daqueles que provavelmente tiveram um resultado falso-reagente no teste de triagem⁶ (TR1).

Procedimento

A amostra com resultado não reagente no teste rápido 1 (TR1) será definida como: “Amostra Não Reagente para HIV”. Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta dessa amostra.

A amostra com resultado reagente no TR1 deverá ser submetida ao teste rápido 2 (TR2). A amostra com resultados reagentes no TR1 e no TR2 terá seu resultado definido como: “Amostra Reagente para HIV”.

A amostra com resultados discordantes entre TR1 e TR2 não terá seu resultado definido. Nesse caso, devem-se repetir os dois testes; persistindo a discordância dos resultados, uma amostra deverá ser coletada por punção venosa e encaminhada para ser testada com um dos fluxogramas definidos para laboratório.

Um teste rápido só pode ter seu resultado interpretado se for considerado um teste válido. Para o teste ser considerado válido, é necessária a presença visual de uma linha ou ponto na região controle (C) do teste. Caso o resultado do TR1 ou do TR2 seja inválido, deve-se repetir o teste com o mesmo conjunto diagnóstico, se possível com um lote distinto do que foi utilizado inicialmente. Persistindo o resultado inválido, uma amostra deverá ser coletada por punção venosa e encaminhada para ser testada com um dos fluxogramas definidos para laboratório.

Desdobramentos do Fluxograma 1

O Fluxograma 1, com a utilização de dois TR, permite um rápido diagnóstico e imediato encaminhamento do indivíduo para atendimento médico, em uma única visita ao serviço de saúde. Nessa ocasião, deverá ser solicitado o teste de quantificação da Carga Viral do HIV (HIV-RNA). A Carga Viral, quando igual ou superior a 5.000 cópias/mL, confirma a infecção pelo HIV. Na eventualidade da Carga Viral ser inferior a 5.000 cópias/mL, deve-se considerar a ocorrência de um duplo resultado falso-positivo (TR1 e TR2) e a não infecção do indivíduo pelo HIV. Nessa situação, recomenda-se a realização de um ensaio sorológico complementar, como o Western blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido para esclarecer se se trata, de fato, de um resultado falso-positivo ou de um indivíduo controlador de elite.

Os TR realizados presencialmente não requerem a coleta de uma segunda amostra, ou seja, não é necessária a coleta de uma nova amostra para confirmar o resultado.

Procedimento

A conduta para a coleta da amostra de fluido oral deve seguir rigorosamente as recomendações do fabricante.

A amostra com resultado não reagente no teste rápido utilizando fluido oral (TR-FO) será definida como: “Amostra Não Reagente para HIV”. Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta dessa amostra.

A amostra com resultado reagente no TR-FO deverá ser submetida ao teste rápido utilizando sangue (TR). A amostra com resultados reagentes no TR-FO e no TR terá seu resultado definido como: “Amostra Reagente para HIV”.

Um teste rápido só pode ter seu resultado interpretado se for considerado um teste válido. Para o teste ser considerado válido é necessária a presença de uma linha ou ponto na região controle (C). Caso o resultado do TR1 ou do TR2 seja inválido, deve-se repetir o teste com o mesmo conjunto diagnóstico, se possível com um lote distinto do que foi utilizado inicialmente. Persistindo o resultado inválido, uma amostra deverá ser coletada por punção venosa e encaminhada para ser testada com um dos fluxogramas definidos para laboratório.

A amostra com resultados discordantes entre TR-FO e TR não terá seu resultado definido. Ambos os testes deverão ser repetidos. Persistindo a discordância, uma amostra deverá ser coletada por punção venosa e encaminhada para ser testada com um dos fluxogramas definidos para laboratório.

Desdobramentos do Fluxograma 2

O Fluxograma 2, com a utilização de dois TR, permite um rápido diagnóstico e imediato encaminhamento do indivíduo para atendimento médico. Nessa ocasião, é solicitada a quantificação da Carga Viral do HIV (HIV-RNA). A Carga Viral igual ou superior a 5.000 cópias/mL confirma a infecção pelo HIV. Na eventualidade de a Carga Viral ser inferior a 5.000 cópias/mL, deve-se considerar a ocorrência de um duplo resultado falso-positivo (TR-FO e TR) e a não infecção do indivíduo pelo HIV. Nessa situação, recomenda-se a realização de um ensaio sorológico complementar, como o Western Blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido para esclarecer se se trata, de fato, de um resultado falso-positivo ou de um indivíduo controlador de elite.

Os TR realizados presencialmente não requerem a coleta de uma segunda amostra, ou seja, não é necessária a coleta de uma nova amostra para confirmar o resultado.

8.2. Propostas de estratégias de testagem em laboratórios

A testagem laboratorial é utilizada para triagem e confirmação de amostras, assim como para a confirmação de amostras encaminhadas após teste de triagem reagente ou com resultados discordantes nos Fluxogramas 1 e 2.

Cada vez mais, os imunoensaios (IE) empregados estritamente em laboratório (e alguns TR) detectam qualquer classe de anticorpos anti-HIV, incluindo IgM, o que melhora a sensibilidade analítica. Como discutido no item 5 - **Sistema de estagiamento laboratorial da infecção recente pelo HIV: Classificação de Fiebig**, na fase inicial da infecção estes IE apresentam maior sensibilidade do que os testes complementares do tipo Western Blot (WB), Imunoblot (IB) e Imunoblot Rápido (IBR).

Além disso, os IE de quarta geração, que detectam simultaneamente antígeno e anticorpo, e os testes moleculares, de amplificação de ácidos nucleicos (NAT), oferecem alternativas para a detecção cada vez mais precoce da infecção pelo HIV. Os fluxogramas propostos com testes utilizados em laboratório incorporaram essas considerações, e oferecem opções que podem ser selecionadas dependendo da capacidade do laboratório e contexto clínico.

Todos os IE utilizados devem possuir antígenos do HIV-1, incluindo o grupo “O”, e do HIV-2.

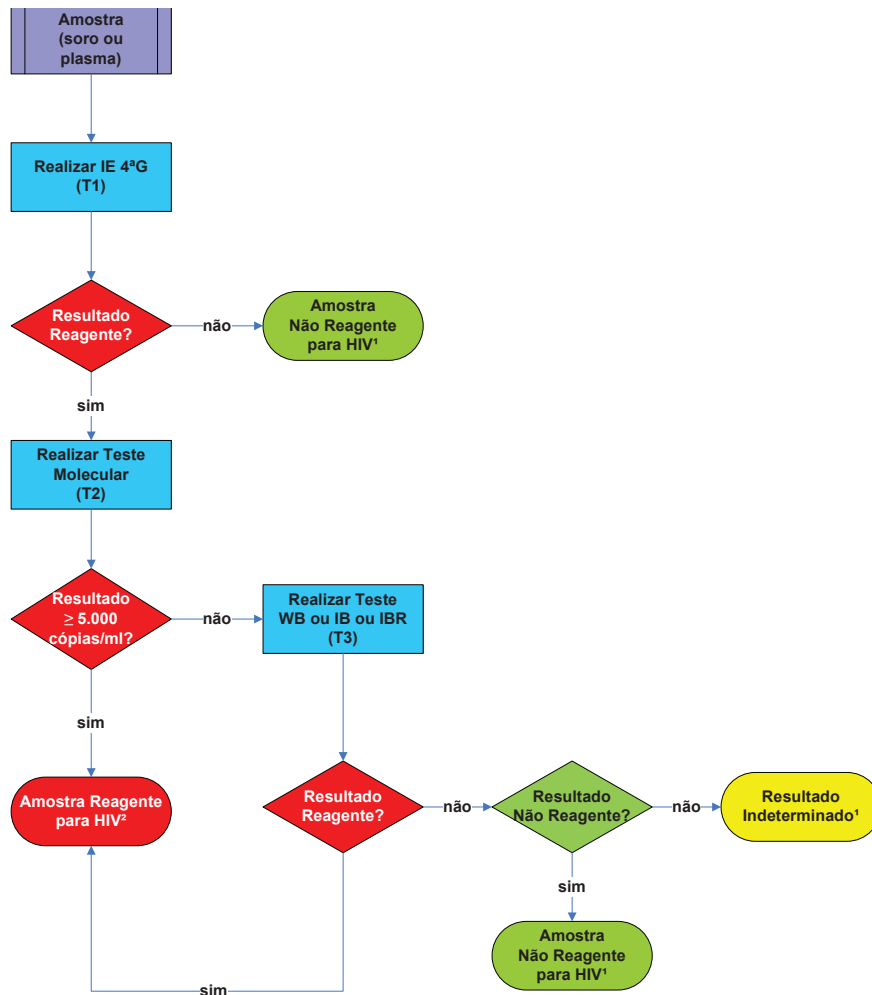
Fluxograma 3

Triagem com Imunoensaio de 4ª Geração e Teste Molecular como Teste Complementar/Confirmatório.

O Fluxograma 3 utiliza um imunoensaio de 4ª geração (IE4ªG) como teste de triagem, e um **teste molecular**⁶ como teste complementar para amostras reagentes na triagem. O IE deve possuir, além de antígenos do HIV-1, também antígenos do HIV-1 grupo "O" e do HIV-2. O IE de triagem, apesar de ser de 4ª geração, é menos sensível do que o teste molecular confirmatório. Portanto, amostras reagentes no teste de triagem e positivas no teste molecular representam infecção pelo HIV. No entanto, uma amostra reagente no IE de triagem, mas negativa no teste molecular, pode representar infecção pelo HIV-2 ou indicar infecção em um indivíduo com Carga Viral abaixo do **limite de detecção**⁶. Esta última situação pode ocorrer também em indivíduos em tratamento com antirretrovirais (ARV) ou em indivíduos denominados controladores de elite. O diagnóstico desses indivíduos pode ser realizado com um teste sorológico confirmatório (WB/IB/IBR).

O Fluxograma 3 é o que permite o diagnóstico mais precoce da infecção pelo HIV.

Figura 16 - Fluxograma 3: IE4ªG + Teste Molecular.



¹ Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra.

² Coletar uma segunda amostra para repetir IE 4ªG para concluir o resultado.

Fluxograma 3		0	I	II	III	IV	V	VI
Triagem	IE4 ^a G							
Confirmatório	TM	xxx	xxx					

Legenda:

	Estágio Fiebig em que o ensaio é positivo
	Estágio Fiebig em que o ensaio não apresenta reatividade
xxx	Amostras que não serão submetidas aos testes complementares/confirmatórios

Fundamentação

O Fluxograma 3 utiliza um IE4^aG como teste de triagem e um teste molecular como teste complementar para amostras reagentes na triagem e, a exemplo do Fluxograma 4 a seguir, aumenta a chance de podermos realizar um diagnóstico de infecção recente pelo HIV. O emprego de um IE de triagem seguido por um teste molecular evita o uso de testes complementares do tipo WB, IB e IBR e elimina resultados negativos ou indeterminados desses testes.

A principal limitação do teste molecular é a possibilidade de ocorrerem resultados falso-positivos, quando utilizados para fins diagnósticos, tendo em vista que a especificidade varia de acordo com o conjunto diagnóstico utilizado. Em sua maioria, resultados falso-positivos tendem a apresentar resultados muito próximos ao limite de detecção do ensaio. Esse perfil requer a repetição do teste para afastar a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos. O DDAHV sugere cautela para essas situações e recomenda que, para fins diagnósticos, os testes moleculares quantitativos que apresentarem número de cópias inferior a 5.000 cp/mL, uma nova amostra seja coletada para repetição do ensaio.

Uma situação que merece especial atenção é aquela em que ocorre um resultado falso-positivo no IE de triagem, tendo como consequência natural um teste molecular negativo. Trata-se de um padrão de resultados semelhante ao que pode ocorrer com indivíduos controladores de elite. Resultados falso-positivos no IE tendem a apresentar uma **relação DO/CO⁶** baixa, enquanto que indivíduos controladores de elite apresentam uma resposta imune humoral normal e uma relação DO/CO alta.

Procedimento

A amostra com resultado não reagente no IE de 4^a geração (IE4^aG) será definida como: “Amostra Não Reagente para HIV”. O laudo deverá ser liberado com a seguinte ressalva: “Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra”.

A amostra com resultado reagente no IE4^aG deverá ser submetida ao teste molecular. A amostra com resultados reagente no IE4^aG e detectável (no caso da utilização de ensaio qualitativo) ou com número de cópias igual ou superior a 5.000 cópias/mL (para fins diagnósticos no caso da utilização de ensaio quantitativo) terá seu resultado definido como: “Amostra Reagente para HIV”.

O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Para comprovação do diagnóstico laboratorial, uma segunda amostra deverá ser coletada e submetida ao primeiro teste do Fluxograma 3 para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em Indivíduos com Idade acima de 18 meses”. Esta segunda amostra deverá ser colhida o mais rapidamente possível e deverá ser testada preferencialmente no mesmo local em que se realizaram os testes com a primeira amostra.

É responsabilidade do profissional de saúde que atender o indivíduo solicitar e identificar o pedido do exame como segunda amostra, e do laboratório ou do serviço de saúde registrá-la como tal para a finalização do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 meses.

Quando o resultado do teste com a segunda amostra for reagente, o resultado deverá ser liberado como: “Amostra Reagente para HIV”. O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Resultado definido com a segunda amostra, conforme estabelecido pela Portaria nº 29 de 17 de dezembro de 2013”.

A amostra com resultado inferior a 5.000 cópias/mL ou indetectável no ensaio molecular não terá o seu resultado definido. Em caso de suspeita de infecção pelo HIV-1, a amostra deverá ser submetida ao ensaio de Western Blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido. A amostra com resultado reagente no Western Blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido terá seu resultado definido como “Amostra Reagente para HIV”. O laudo laboratorial deverá reportar o resultado de todas as bandas reativas encontradas nos testes Western Blot, Imunoblot e Imunoblot Rápido e incluir a seguinte ressalva: “Para comprovação do diagnóstico laboratorial, uma segunda amostra deverá ser coletada e submetida ao primeiro teste do Fluxograma 3 para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em Indivíduos com Idade acima de 18 meses”. Esta segunda amostra deverá ser colhida o mais rapidamente possível e deverá ser testada preferencialmente no mesmo local em que se realizaram os testes com a primeira amostra.

É responsabilidade do profissional de saúde que atender o indivíduo solicitar e identificar o pedido do exame como segunda amostra, e do laboratório ou do serviço de saúde registrá-la como tal para a finalização do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 meses.

Quando o resultado do teste com a segunda amostra for reagente, o resultado deverá ser liberado como: “Amostra Reagente para o HIV”. O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Resultado definido com a segunda amostra, conforme estabelecido pela Portaria nº 29 de 17 de dezembro de 2013”.

A amostra com resultado negativo ou indeterminado no Western Blot ou Imunoblot ou Imunoblot Rápido terá seu resultado definido como “Amostra Indeterminada para HIV”. É obrigatória a liberação desse resultado e o laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Persistindo a suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra”. A nova amostra deverá ser colhida e submetida novamente ao fluxograma, preferencialmente no mesmo local em que se realizou o teste com a primeira amostra. Caso o resultado com a nova amostra permaneça indeterminado, deve-se considerar a possibilidade de infecção pelo HIV-2. Nesse caso, o DDAHV deverá ser contatado para orientar quanto aos procedimentos para o envio da amostra ao Laboratório de Referência Nacional para HIV-2, com vistas à confirmação da infecção.

Laudos

Além das informações citadas anteriormente, os laudos devem conter os resultados de todos os testes realizados e deverão ser expressos o resultado numérico da amostra, o ponto de corte (*cut-off*) e a unidade de medição do método utilizado, quando os resultados forem reagentes ou indeterminados, excetuando-se os resultados obtidos por testes cuja leitura é visual. Os testes moleculares quantitativos devem conter o número de cópias/mL e a escala logarítmica em base 10.

Considerações para a utilização do Fluxograma 3

Existem três situações nas quais esse fluxograma necessita que testes adicionais sejam realizados para a definição do diagnóstico:

1º Em indivíduos controladores de elite que desenvolvem anticorpos normalmente, mas podem apresentar Carga Viral inferior a 5.000 cópias/mL, levando a um resultado falso-negativo;

2º Embora os IE4^aG detectem anticorpos anti-HIV-2, alguns testes moleculares não são desenvolvidos para detectar o ácido nucleico do HIV-2. Portanto, havendo suspeita de infecção pelo HIV-2, o DDAHV deverá ser contatado para encaminhar a resolução do diagnóstico;

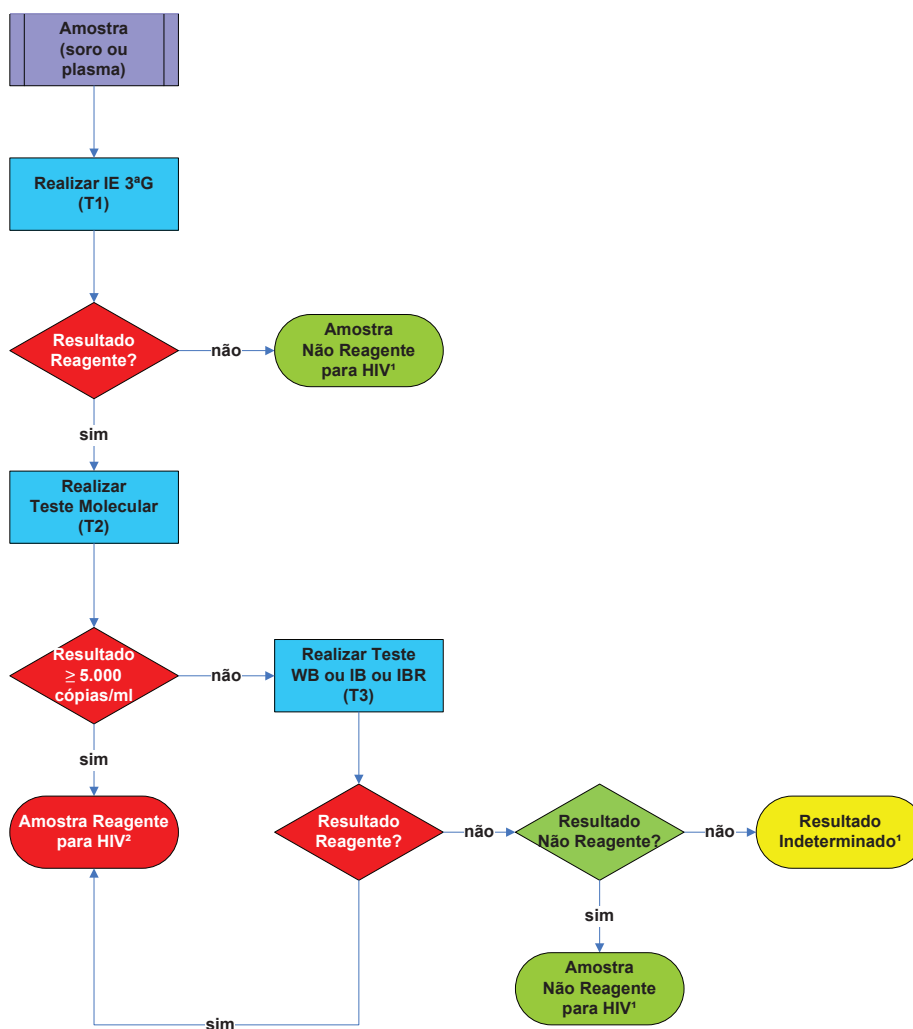
3º Em amostras que apresentarem resultado falso positivo no teste 1 - teste de triagem.

Fluxograma 4

Triagem com Imunoensaio de 3ª Geração e Teste Molecular como Teste Complementar/Confirmatório.

O Fluxograma 4 utiliza um imunoensaio de 3ª geração (IE3ªG) como teste de triagem e oferece a opção de utilizar um teste molecular como teste complementar/confirmatório para amostras reagentes na triagem. Os Fluxogramas 3 e 4 diferem na geração do IE utilizado na etapa inicial. O IE deve possuir além de antígenos do HIV-1, também antígenos do HIV-1 grupo "O" e do HIV-2. Nesse fluxograma, o IE de triagem é menos sensível do que o teste molecular. Portanto, amostras reagentes no teste de triagem e detectáveis (qualitativo) ou com contagem igual ou superior a 5.000 cópias/mL (quantitativo) no teste molecular, representam infecção pelo HIV. No entanto, uma amostra reagente no IE de triagem, mas negativa no teste molecular, pode representar infecção pelo HIV-2 ou indicar infecção em um indivíduo com Carga Viral abaixo do limite de detecção. Esta última situação pode ocorrer em indivíduos em tratamento com ARV ou em indivíduos denominados controladores de elite.

Figura 17 - Fluxograma 4: IE3ªG + Teste Molecular.



¹ Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra.

² Coletar segunda amostra e repetir o IE de 3ªG para concluir o resultado.

Fluxograma 4		0	I	II	III	IV	V	VI
Triagem	IE3 ^a G							
Confirmatório	TM	xxx	xxx	xxx				

Legenda:

	Estágio Fiebig em que o ensaio é positivo
	Estágio Fiebig em que o ensaio não apresenta reatividade
xxx	Amostras que não serão submetidas aos testes complementares/confirmatórios

Fundamentação

Esse fluxograma apresenta a opção de utilizar um teste molecular como teste complementar/confirmatório, e também um ensaio de triagem, que detecta anticorpos das classes IgM e IgG e inclui antígenos do HIV-2 e HIV-1 grupo "0". Esse fluxograma representa um avanço para os laboratórios que realizam em sua rotina testes moleculares qualitativos ou quantitativos para a detecção/monitoramento da infecção pelo HIV. A principal vantagem do teste molecular nesse fluxograma, em relação ao Fluxograma 5 a seguir, é o potencial de eliminar resultados negativos ou indeterminados de testes complementares do tipo WB, IB e IBR.

A principal limitação do teste molecular é a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos, quando utilizados para fins diagnósticos, tendo em vista que a especificidade varia de acordo com o conjunto diagnóstico utilizado. Em sua maioria, os resultados falso-positivos tendem a apresentar resultados muito próximos ao limite de detecção do ensaio. Esse perfil requer a repetição do teste para afastar a possibilidade de resultado falso-positivo. O DDAHV sugere cautela para essas situações e recomenda que, para fins diagnósticos, com a utilização de testes moleculares quantitativos com número de cópias inferior a 5.000 cp/mL uma nova amostra seja coletada para repetição do ensaio.

Uma situação que merece especial atenção é aquela em que ocorre um resultado falso-positivo no IE de triagem, tendo como consequência natural um teste molecular negativo. Trata-se de um padrão de resultados semelhantes ao que pode ocorrer com indivíduos controladores de elite. Resultados falso-positivos no IE tendem a apresentar uma relação DO/CO baixa, enquanto que indivíduos controladores de elite apresentam uma resposta imune humoral normal e uma relação DO/CO alta.

Procedimento

A amostra com resultado não reagente no IE de 3^a geração (IE3^aG) será definida como: "Amostra Não Reagente para HIV". O laudo deverá ser liberado com a seguinte ressalva: "Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra".

A amostra com resultado reagente no IE3^aG deverá ser submetida ao Teste Molecular. A amostra com resultado reagente no IE3^aG e detectável (no caso da utilização de ensaio qualitativo) ou com número de cópias igual ou superior a 5.000 cópias/mL (para fins diagnósticos no caso da utilização de ensaio quantitativo) terá seu resultado definido como: "Amostra Reagente para HIV".

O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: "Para comprovação do diagnóstico laboratorial, uma segunda amostra deverá ser coletada e submetida ao primeiro teste do Fluxograma 4 para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em Indivíduos com Idade acima de 18 meses". Esta segunda amostra deverá ser colhida o mais rapidamente possível e deverá ser testada preferencialmente no mesmo local em que se realizaram os testes com a primeira amostra.

É responsabilidade do profissional de saúde que atender o indivíduo solicitar e identificar o pedido do exame como segunda amostra, e do laboratório ou do serviço de saúde registrá-la como tal para a finalização do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 meses.

Quando o resultado do teste com a segunda amostra for reagente, o resultado deverá ser liberado como: "Amostra Reagente para o HIV". O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: "Resultado definido com a segunda amostra, conforme estabelecido pela Portaria nº 29 de 17 de dezembro de 2013".

A amostra com resultado inferior a 5.000 cópias/mL ou indetectável no ensaio molecular não terá o seu resultado definido. Em caso de suspeita de infecção pelo HIV-1, a amostra deverá ser submetida ao ensaio de Western Blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido. A amostra com resultado reagente no Western Blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido terá seu resultado definido como “Amostra Reagente para HIV”. O laudo laboratorial deverá reportar o resultado de todas as bandas reativas encontradas nos testes Western Blot, Imunoblot e Imunoblot Rápido e incluir a seguinte ressalva: “Para comprovação do diagnóstico laboratorial, uma segunda amostra deverá ser coletada e submetida ao primeiro teste do Fluxograma 4 para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em Indivíduos com Idade acima de 18 meses”. Esta segunda amostra deverá ser colhida o mais rapidamente possível, e deverá ser testada, preferencialmente no mesmo local em que se realizaram os testes com a primeira amostra.

É responsabilidade do profissional de saúde que atender o indivíduo solicitar e identificar o pedido do exame como segunda amostra, e do laboratório ou do serviço de saúde registrá-la como tal para a finalização do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 meses.

Quando o resultado do teste com a segunda amostra for reagente, o resultado deverá ser liberado como: “Amostra Reagente para o HIV”. O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Resultado definido com a segunda amostra, conforme estabelecido pela Portaria nº 29 de 17 de dezembro de 2013”.

A amostra com resultado negativo ou indeterminado no Western blot ou Imunoblot ou Imunoblot Rápido terá seu resultado definido como “Amostra Indeterminada para HIV”. É obrigatória a liberação desse resultado e o laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Persistindo a suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada, 30 dias após a data da coleta desta amostra”. A nova amostra deverá ser colhida e submetida novamente ao fluxograma, preferencialmente no mesmo local em que se realizou o teste com a primeira amostra. Caso o resultado com a nova amostra permaneça indeterminado, deve-se considerar a possibilidade de infecção pelo HIV-2. Nesse caso, o DDAHV deverá ser contatado para orientar quanto aos procedimentos para o envio da amostra ao Laboratório de Referência Nacional para HIV-2, com vistas à confirmação da infecção.

Laudos

Além das informações citadas anteriormente, os laudos devem conter os resultados de todos os testes realizados e deverão ser expressos o resultado numérico da amostra, o ponto de corte (*cut-off*) e a unidade de medição do método utilizado, quando os resultados forem reagentes ou indeterminados, excetuando-se os resultados obtidos por testes cuja leitura é visual. Os testes moleculares quantitativos devem conter o número de cópias/mL e a escala logarítmica em base 10.

Considerações para a utilização do Fluxograma 4

Existem três situações nas quais esse fluxograma necessita que testes adicionais sejam realizados para a definição do diagnóstico:

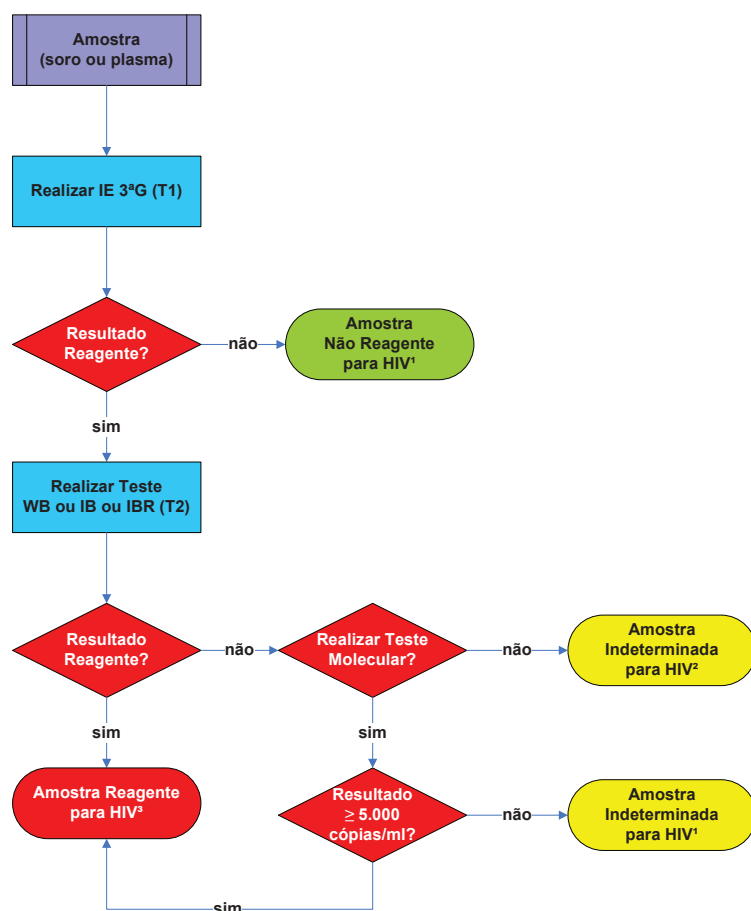
- 1º Em indivíduos controladores de elite que desenvolvem anticorpos normalmente, mas podem apresentar Carga Viral indetectável ou muito baixa, levando a um resultado falso-negativo;
- 2º Embora o IE3^aG detecte anticorpos anti-HIV-2, alguns testes moleculares não são desenvolvidos para detectar o ácido nucleico do HIV-2. Portanto, havendo suspeita de infecção pelo HIV-2, o DDAHV deverá ser contatado para encaminhar a resolução do diagnóstico;
- 3º Em amostras que apresentarem resultado falso positivo no teste 1 - teste de triagem.

Fluxograma 5

Triagem com Imunoensaio de 3ª Geração e Western blot, Imunoblot ou Imunoblot Rápido como Teste Complementar/Confirmatório.

O Fluxograma 5 é a representação do fluxograma convencional e atualmente não representa um avanço no esforço de tornar o diagnóstico do HIV mais precoce, preciso e com custo mais acessível. O único avanço oferecido é a indicação de que, quando possível, seja realizado um teste molecular nas amostras que apresentarem resultado indeterminado ou discordante entre os testes. Esse fluxograma oferece a opção de utilizar um imunoensaio de 3ª geração como teste de triagem e um teste sorológico complementar/confirmatório do tipo WB/IB/IBR para amostras reativas na triagem. Cabe ressaltar que o IE de triagem é mais sensível do que os testes complementares (WB/IB/IBR).

Figura 18 - Fluxograma 5: IE3^aG + WB/IB/IBR.



¹ Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra.

² Emitir resultado indeterminado e coletar nova amostra após 30 dias da data da coleta.

³ Coletar segunda amostra e repetir o IE de 3ªG para concluir o resultado.

Legenda: Processo predefinido. Processo. Exige uma tomada de decisão. Finalizador.

Fluxograma 5	Teste	0	I	II	III	IV	V	VI
Triagem	IE 3 ^o G							
Complementar	WB	xxx	xxx	xxx				
Complementar	TM	xxx	xxx	xxx			xxx	xxx

Legenda:

	Estágio Fiebig em que o ensaio é positivo
	Estágio Fiebig equivalente a WB indeterminado
	Estágio Fiebig em que o ensaio não apresenta reatividade
xxx	Amostras que não serão submetidas aos testes complementares/confirmatórios

Fundamentação

Diante dos avanços tecnológicos, esse fluxograma apresenta limitações, apesar de ter tido uma ampla utilização. No entanto, se acrescido de um teste molecular para amostras negativas ou indeterminadas, torna o diagnóstico mais precoce e preciso; porém, é mais oneroso do que os fluxogramas anteriormente apresentados.

Procedimento

A amostra com resultado não reagente no IE de 3^a geração (IE3^oG) será definida como: “Amostra Não Reagente para HIV”. O laudo deverá ser liberado com a seguinte ressalva: “Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra”.

A amostra com resultado reagente no IE3^oG deverá ser submetida ao Western Blot ou Imunoblot ou Imunoblot Rápido. A amostra com resultados reagentes no IE3^oG e no WB/IB/IBR terá seu resultado definido como: “Amostra Reagente para HIV”. O laudo laboratorial deverá reportar o resultado de todas as bandas reativas encontradas nos testes Western Blot, Imunoblot e Imunoblot Rápido e incluir a seguinte ressalva: “Para comprovação do diagnóstico laboratorial, uma segunda amostra deverá ser coletada e submetida ao primeiro teste do Fluxograma 5 para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em Indivíduos com Idade acima de 18 meses”. Esta segunda amostra deverá ser colhida o mais rapidamente possível, e deverá ser testada, preferencialmente no mesmo local em que se realizaram os testes com a primeira amostra.

Quando o resultado do teste com a segunda amostra for reagente, o resultado deverá ser liberado como: “Amostra Reagente para o HIV”. O laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Resultado definido com a segunda amostra, conforme estabelecido pela Portaria nº 29 de 17 de dezembro de 2013”.

No caso de ocorrer resultado indeterminado no IE3^oG, deve-se solicitar uma nova **amostra do paciente**⁶ e reiniciar o fluxograma. Persistindo o resultado indeterminado com a nova amostra, deve-se considerar a possibilidade da utilização de um fluxograma que inclua a realização de testes moleculares (RNA e/ou DNA), para auxiliar na definição do diagnóstico.

Amostra com resultado reagente no IE3^oG e resultado indeterminado ou não reagente no WB/IB/IBR terá seu resultado definido como “Amostra Indeterminada para HIV”. Deve-se considerar a possibilidade da utilização de um fluxograma que inclua a realização de testes moleculares (RNA e/ou DNA), para auxiliar na definição desse diagnóstico. Caso o teste molecular não possa ser realizado, deve-se liberar o resultado e o laudo laboratorial deverá incluir a seguinte ressalva: “Persistindo a suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada, 30 dias após a data da coleta desta amostra”.

O IBR é um teste rápido, e como todo teste rápido somente pode ter seu resultado interpretado se for válido. Isso significa presença de linha na janela de leitura do controle (C). Caso se opte pela utilização desse teste e ocorrer resultado inválido, deve-se repetir o teste com o mesmo conjunto diagnóstico, se possível com um lote distinto do que foi utilizado inicialmente. Persistindo o resultado inválido, uma nova amostra deverá ser coletada para esclarecer o diagnóstico.

Laudos

Além das informações citadas anteriormente, os laudos devem conter os resultados de todos os testes realizados e deverão ser expressos o resultado numérico da amostra, o ponto de corte (*cut-off*) e a unidade de medição do método utilizado, quando os resultados forem reagentes ou indeterminados, excetuando-se os resultados obtidos por testes cuja leitura é visual. Os testes moleculares quantitativos devem conter o número de cópias/mL e a escala logarítmica em base 10.

9. ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DA INFECÇÃO PELO HIV EM CRIANÇAS MENORES DE 18 MESES

A identificação precoce da criança infectada verticalmente é essencial para o início da terapia antirretroviral, para a profilaxia das infecções oportunistas e para o manejo das intercorrências infecciosas e dos distúrbios nutricionais.

A passagem transplacentária de anticorpos maternos do tipo IgG anti-HIV, principalmente no terceiro trimestre de gestação, interfere no diagnóstico sorológico da infecção vertical. Os anticorpos maternos podem persistir até os 18 meses de idade. Portanto, métodos que realizam a detecção de anticorpos não são recomendados para o diagnóstico em crianças menores de 18 meses de idade, sendo necessária a realização de testes moleculares, como a quantificação do RNA viral (Carga Viral), disponibilizada pela DDAHV do Ministério da Saúde.

A Carga Viral, para fins diagnósticos em crianças com idade inferior a 18 meses deve ser realizada considerando as indicações a seguir relacionadas:

1. A primeira Carga Viral deve ser colhida com quatro (4) semanas de vida ou preferencialmente seis (6) semanas, se a criança tiver recebido profilaxia antirretroviral;
2. Em recém-nascidos sintomáticos, a Carga Viral pode ser colhida em qualquer momento;
3. Deve-se realizar, imediatamente, a primeira Carga Viral em crianças que foram amamentadas;
4. Em crianças cuja primeira amostra tenha sido colhida em idade superior a quatro meses, a segunda coleta pode ser realizada com intervalo mínimo de um mês;
5. Caso a Carga Viral tenha um resultado detectável, esta deve ser repetida com nova amostra assim que possível. Se a segunda Carga Viral também for detectável, considera-se a criança como infectada pelo HIV;
6. Caso a primeira Carga Viral tenha um resultado indetectável, esta deverá ser repetida após o 4º mês de vida. Se a segunda Carga Viral também for indetectável, considera-se a criança não infectada;
7. Resultados positivos com Carga Viral abaixo de 5.000 cópias/mL devem ser cuidadosamente analisados, devido à possibilidade de um resultado falso-positivo;
8. A documentação da sororeversão da criança não infectada pelo HIV deve ser realizada com uma sorologia para HIV não reagente após 18 meses. A proporção de crianças que sororevertem em até 12 meses de idade é de 95%, ficando a critério médico a solicitação de sorologia nessa idade;
9. Em raras situações, crianças não infectadas pelo HIV podem apresentar anticorpos maternos residuais até 24 meses de vida (sororevertores tardios). Essas crianças geralmente apresentam o IE reagente, mas o teste confirmatório (WB, IB ou IBR) indeterminado. Nessas situações, deve-se repetir a sorologia até a obtenção de resultado não reagente.

Para o manejo clínico de crianças confirmadamente infectadas e esclarecimento de outras dúvidas quanto ao diagnóstico infantil, deve-se consultar o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Pediatria, disponível em www.aids.gov.br

10. SITUAÇÕES ESPECIAIS DO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV

10.1. Recomendação para Diagnóstico de Infecção Aguda pelo HIV-1

Essa recomendação está indicada para os casos nos quais o médico suspeita de infecção aguda pelo HIV. Nessas situações, a detecção da infecção pelo HIV, imediatamente após o período de eclipse, pode fornecer informação importante por permitir a imediata instituição da terapia antirretroviral e, potencialmente, evitar a disseminação do HIV.

Havendo suspeita clínica de infecção aguda pelo HIV, a amostra deve ser submetida a um IE de 4ª geração. Em caso de resultado reagente no IE4ªG, a amostra deve ser submetida ao Fluxograma 3. Em caso de amostra não reagente no IE4ªG, a amostra deve ser submetida a um teste molecular. Os seguintes resultados podem ocorrer:

a) Em caso de resultado igual ou superior a 5.000 cópias/mL (ensaio quantitativo) ou detectável (ensaio qualitativo), o resultado deverá ser confirmado em uma nova amostra, a ser obtida 30 dias após a data da coleta da primeira amostra. A nova amostra deve ser testada com um ensaio capaz de detectar anticorpos (IE, WB, IB ou IBR), seguindo-se as recomendações dos Fluxogramas 3, 4 ou 5. É importante o acompanhamento do paciente até que ocorra a soroconversão para concluir o diagnóstico.

b) Em caso de resultado inferior a 5.000 cópias/mL (ensaio quantitativo) ou indetectável (ensaio qualitativo), a amostra será definida como: "Amostra Não Reagente para HIV". O laudo deverá ser liberado com a seguinte ressalva: "Em caso de suspeita de infecção pelo HIV, uma nova amostra deverá ser coletada 30 dias após a data da coleta desta amostra".

10.2. Recomendações para Diagnóstico da Infecção pelo HIV-2

A testagem para HIV-2 deve ser considerada sempre nos casos em que um indivíduo apresente suspeita epidemiológica de risco pelo HIV-2, como:

- a) Parcerias sexuais de países onde o HIV-2 é endêmico;
- b) Parcerias sexuais sabidamente infectadas pelo HIV-2;
- c) Transusão de sangue ou injeções com agulhas não estéreis em países onde o HIV-2 é endêmico;
- d) Compartilhamento de agulhas com indivíduos de um país onde o HIV-2 é endêmico ou com uma pessoa conhecida por estar infectada com HIV-2;
- e) Filhos de mulheres que têm fatores de risco para o HIV-2.

Também se deve suspeitar de infecção pelo HIV-2 nos seguintes casos:

- a) Suspeita clínica de aids, na ausência de um teste positivo para anticorpos anti-HIV-1, ou um WB para HIV-1 com os padrões indeterminados incomuns, tais como *gag* p55, p24 ou p17, mais bandas da polimerase p66, p51 (transcriptase reversa) ou p31 (integrase);
- b) Pacientes com Carga Viral indetectável com sintomatologia ou contagem de linfócitos T CD4⁺ decrescente;
- c) Teste sorológico de triagem positivo e WB ou teste molecular negativo, sempre que houver um elo epidemiológico com países endêmicos para HIV-2;
- d) Testes sorológicos que indiquem reatividade para a proteína gp36 ou gp105 do HIV-2.

Em qualquer um desses casos de suspeita de infecção pelo HIV-2, o DDAHV deverá ser contatado para encaminhar a resolução do diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- ABNT NBR NM ISO 15189:2007. *Laboratórios de análises clínicas: Requisitos especiais de qualidade e competência*.
- BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 4 ed.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. HIV: *Estratégias para Diagnóstico no Brasil*. Brasília, 2010. 82 p. Série Telelab.
- BRIGIDO, L. F.; NUNES, C. C.; OLIVEIRA, C. M.; KNOLL, R. K.; FERREIRA, J. L.; FREITAS, C. A.; ALVES, M. A.; DIAS, C.; RODRIGUES, R.; Research Capacity Program. HIV type 1 Subtype C and CB Pol Recombinants prevail at the cities with the highest Aids prevalence rate in Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses*, [S.l.], v. 23, n. 12, p.1579-86, 2007.
- BUTTÒ, S.; SULIGOI, B.; FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 24-33, 2010.
- CABRAL, V. P.; CUNHA, C. B.; MAGALHAES, E. F.; PINTO-NETO, L. F.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; DIETZE, R.; MORGADO, M. G.; RIBEIRO-RODRIGUES, R. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.l.], v. 101, n. 8, p. 881-5, 2006.
- CLSI. *Criteria for Laboratory Testing and Diagnosis of HIV Infection; Approved Guideline*. CLSI document M53-A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- COHEN, S. M.; GAY, L. C.; BUSCH, P. M.; HECTH, M. F. The Detection of Acute HIV Infection, *The Journal of Infectious Diseases*, 2010.
- COUTO-FERNANDEZ, J. C.; MORGADO, M. G.; BONGERTZ, V.; TANURI, A.; ANDRADE, T.; BRITES, C.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 288-93, 1999.
- DE OLIVEIRA, C. M.; ALMEIDA, F. J.; RODRIGUES, R.; CROZATTI, M.; VAZQUEZ, C. M.; DO SOCORRO CARNEIRO FERRÃO, M.; CAMPEAS, A. E.; MARQUES, S. R.; BEREZIN, E. N.; DE MACEDO BRÍGIDO, L. F. High frequency of BF mosaic genomes among HIV-1-infected children from Sao Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, [S.l.], v. 153, n. 10, p. 1799-806, 2008.
- DE SA-FILHO, D. J.; AMBAR, R. F.; DUARTE, N. B.; MATIAS, R. B.; CANDIDO, V.; GAGLIANI, L. H.; CASEIRO, M. M. HIV type 1 diversity from newly diagnosed patients in Santos metropolitan area/Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses*, [S.l.], v. 25, n. 9, p. 925-9, 2009.
- DE SA-FILHO, D. J.; SOARES, M. D. A. S.; CANDIDO, V.; GAGLIANI, L. H.; CAVALIERE, E.; DIAZ, R. S.; CASEIRO, M. M. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses*, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 347-53, 2008.
- DUMANS, A. T.; SOARES, M. A.; PIENIAZEK, D.; KALISH, M. L.; DE VROEY, V.; HERTOOGS, K.; TANURI, A. Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemother*, [S.l.], v. 46, n. 9, p. 3075-9, 2002.
- DYKES, C.; DEMETER, L. M. Clinical Significance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Fitness. *Clinical Microbiology Reviews*, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 550-78, 2007.
- FACENTE, S. N.; PILCHER, C. D.; HARTOGENSIS, W. E.; KLAUSNER, J. D.; PHILIP, S. S.; LOUIE, B.; CHRISTOPOULOS, K. A.; DOWLING, T.; COLFAX, G. N. Performance of risk-based criteria for targeting acute HIV screening in San Francisco. *PLoS One*, [S.l.], v. 6, n. 7, p. e21813, 2011.
- FERREIRA JR., O. C.; FERREIRA, C.; RIEDEL, M.; WIDOLIN, M. R. V.; CRIPPEN, P.; BARBOSA JR., A.; BRADY, W.; for the hiv rapid test study group. Evaluation of Rapid Tests for anti-HIV Detection in Brazil. *Aids* [S.l.], v. 19, suppl. 4, p.S70-S75, 2005.

FIEBIG, E. W.; WRIGHT, D. J.; RAWAL, B. D.; GARRETT, P. E.; SCHUMACHER, R. T.; PEDDADA, L.; HELDEBRANT, C.; SMITH, R.; CONRAD, A.; KLEINMAN, S. H.; BUSCH, M.P. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids*, [S.l.], v. 17, p. 1871-1879, 2003.

GADELHA, S. R.; SHINDO, N.; CRUZ, J. N.; MORGADO, M. G.; GALVÃO-CASTRO, B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.l.], v. 98, n. 4, p.461-3, 2003.

GRANADE, T. C.; PHILLIPS, S. K.; BELL, C. J.; PAU, C. P.; PAREKH, B.; HANNON, W. H.; GWINN, M.; REDUS, M. A.; SCHOCHETMAN, G.; GEORGE, J. R. Factors influencing HIV-1 banding patterns in miniaturized western blot testing of dried blood spot specimens. *Journal of Immunological Methods*, [S.l.], v. 154, n. 2, p.225-233, 1992.

KAHN, J. O.; WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, p. 33-39, 1998.

LEELAWIWAT, W.; YOUNG, N. L.; CHAOWANACHAN, T.; OU, C. Y.; CULNANE, M.; VANPRAPA, N.; WARANAWA, T. N.; WASINRAPEE, P.; MOCK, P. A.; TAPPERO, J.; MCNICHOLL, J. M. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of Virological Methods*, [S.l.], v. 155, n. 2, p.109-117, 2009.

LIU, L.; GENTRY, J.; LOVCHIK, J. Accuracy of Anti-HIV 1+2 Signal-to-Cut Off Ratio in Predicting HIV-1 Confirmatory Test Results. Oral presentation at the HIV Diagnostics Conference, Atlanta, USA, 2012. Resumo disponível em: <<https://custom.cvent.com/ADE0EB81B3184D618E2FB8340F1EC28E/files/29f3717707a44f91859f65feb4cefec6.pdf>>, acesso em: 30 nov. 2013.

LOCATELLI, D.; STOCO, P. H.; DE QUEIROZ, A. T.; ALCÂNTARA, L. C.; FERREIRA, L. G.; ZANETTI, C. R.; RODRIGUES, R.; GRISARD, E. C.; PINTO, A. R. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of Subtype C in Southern Brazil. *Journal of Medical Virology*, [S.l.], v. 79, p. 1455-63, 2007.

MCMICHAEL, A.; BORROW, P.; TOMARAS, G. D. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews*, [S.l.], v. 10, p. 11-23, 2010.

MILLER, L. E. Laboratory Diagnosis of HIV Infection. In: STEVENS, C.D. *Clinical immunology and serology: a laboratory perspective*. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2010. 476 p. 3. ed.

MONTEIRO, J. P.; ALCANTARA, L. C.; DE OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A. M.; MELO, M. A.; BRITES, C.; GALVÃO-CASTRO, B. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. *Journal of Medical Virology*, [S.l.], v. 81, n. 3, p. 391-9, 2009.

MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.l.], v. 97, n. 2, p.143-50, 2002.

MURPHY, G.; AITKEN, C. HIV testing-The perspective from across the pond. *Journal of Clinical Virology*, [S.l.], v. 52, Supp. 1, p. S71-S76, 2011.

OU, C. Y.; FISCUS, S.; ELLENBERGER, D.; PAREKH, B.; KORHONEN, C.; NKENGASONG, J.; BULTERYS, M. Early diagnosis of HIV infection in the breastfed infant. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, [S.l.], v. 743, p. 51-65, 2012.

OU, C. Y.; YANG, H.; BALINANDI, S.; SAWADOGO, S.; SHANMUGAM, V.; TIH, P. M.; ADJE-TOURE, C.; TANCHU, S.; YA, L. K.; BULTERYS, M.; DOWNING, R.; NKENGASONG, J. N. Identification of HIV-1 infected infants and young children using real-time RT PCR and dried blood spots from Uganda and Cameroon. *Journal of Virological Methods*, [S.l.], v. 144, n.1-2, p.109-114, 2007.

OWEN, S. M. Testing for acute HIV infection: implication for treatment as prevention. *Current Opinion*, [S.l.], v. 7, n. 2, 2012.

PILCHER, C. D.; EATON, L.; KALICHMAN, S.; BISOL, C.; DE SOUZA, R. D. A. S. Approaching “HIV elimination”: interventions for acute HIV infection. *Current HIV/Aids Report*, [S.l.], v. 3, n. 4, p.160-168, 2006.

PIRES, I. L.; SOARES, M. A.; SPERANZA, F. A.; ISHII, S. K.; VIEIRA, M. C.; GOUVÊA, M. I.; GUIMARÃES, M. A.; DE OLIVEIRA, F. E.; MAGNANINI, M. M.; BRINDEIRO, R. M.; TANURI, A. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, [S.l.], v. 42, n. 1, p. 426-30, 2004.

SÁEZ-CIRIÓN, A.; PANCINO, G. HIV controllers: a genetically determined or inducible phenotype. *Immunological Reviews*, [S.l.], v. 254, p. 281-94, 2013.

SIMON, V.; HO, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: implicatins for therapy. *Nature Reviews Microbiology*, [S.l.], v. 1, p. 181-190, 2003.

SOARES, E. A.; SANTOS R.P.; PELLEGRINI J.A.; SPRINZ E.; TANURI A.; SOARES M.A. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, [S.l.], v. 34, n. 5, p. 520-6, 2003.

STEFANI, M. M.; PEREIRA, G. A.; LINS, J. A.; ALCANTARA, K. C.; SILVEIRA, A. A.; VIEGAS, A. A.; MAYA, N. C.; MUSSI, A. H. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West of Brazil. *Journal of Clinical Virology*, [S.l.], v. 39, n. 3, p. 205-9, 2007.

UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/Aids/STI Surveillance. *Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance: selection, evaluation and implementation, 2009 update*. Geneva, World Health Organization, 2009.

VERAS, N. M. C. História Evolutiva do HIV-1 no Brasil. 2010. 228 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília. 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10482/7430>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

WATTS, J. M.; DANG, K. K.; GORELICK, R. J.; LEONARD, C. W.; BESS JR, J. W.; SWANSTROM, R.; BURCH, C. L.; WEEKS, K. M. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, [S.l.], v. 460, n. 7256, p. 711-6, 2009.

