



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES VIRAIS  
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV**

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Análise comparativa entre metodologias de sorodiagnóstico  
confirmatórias para HIV-2 em amostras de pacientes atendidos no  
Hospital Universitário Gaffrée e Guinle entre os anos de  
2000 até 2015.**

**Isabelle Vasconcellos de Souza**

**RIO DE JANEIRO  
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES VIRAIS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV**

**Análise comparativa entre metodologias de sorodiagnóstico  
confirmatórias para HIV-2 em amostras de pacientes atendidos no  
Hospital Universitário Gaffrée e Guinle entre os anos de  
2000 até 2015**

**Isabelle Vasconcellos de Souza**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Dr. Orlando Costa Ferreira Junior**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre em infecção  
HIV/AIDS e Hepatites Virais na  
Área de Doenças infecciosas e  
parasitárias.

**Rio de Janeiro**

**2017**

S729 Souza, Isabelle Vasconcellos de  
Análise comparativa entre metodologias de sorodiagnóstico confirmatórias para HIV-2 em amostras de pacientes atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle entre os anos de 2000 até 2015 / Isabelle Vasconcellos de Souza. -- Rio de Janeiro, 2017.  
80 f.

Orientador: Orlando Costa Ferreira Junior.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais, 2017.

1. HIV-2. 2. Diagnóstico de HIV. 3. Testes confirmatórios HIV. I. Ferreira Junior, Orlando Costa, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - PROPG  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS**  
*Programa de Pós-Graduação em Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais - PPGHIV/HV*

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Isabelle Vasconcellos de Souza**

**"Análise comparativa entre metodologias de sorodiagnóstico confirmatórias para HIV-2 em amostras de pacientes atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle entre os anos de 2000 até 2015."**

Aprovado(a) pela Banca Examinadora

Rio de Janeiro, 01 / 08 / 2017

Prof. Dr. Orlando Costa Ferreira Júnior – UNIRIO/RJ  
(orientador)

Prof. Dr. Luiz Cláudio Pereira Ribeiro – UNIRIO/RJ  
(membro interno)

Prof.ª Dr.ª Amanda Torrentes de Carvalho – FIOCRUZ/RJ  
(membro externo)

Prof. Dr. Fernando Samuel Sion – UNIRIO/RJ  
(suplente interno)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite – FAT/AL  
(suplente externo)

Dedico esse trabalho a minha mãe que se esforçou para que eu tivesse a melhor educação possível, me ensinou valores morais e me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

... À Deus e aos meus mentores espirituais por me direcionarem ao caminho das ciências biomédicas e mostrarem diariamente a importância de profissionais capazes e competentes;

... à minha mãe, Elisabete Vasconcellos, que me auxiliou em toda minha jornada e, em especial, durante a realização desta pesquisa enquanto lutava contra o câncer. Mostrou-me sempre a importância da perseverança, abnegação e amor;

... à minha irmã e meu pai, por serem o início, meio e o fim de tudo na minha vida;

... ao Professor Orlando C. Ferreira Jr. pela dedicação na orientação deste trabalho, sempre à disposição quando solicitado a ler, corrigir e direcionar meus passos mesmo com sua intensa rotina de trabalho e por confiar nas minhas capacidades, incentivando a realização desta dissertação;

... à Deise Costa e Liane Ribeiro pela contribuição e tempo empregados no ensinamento das técnicas e discussões de resultados;

... ao Professor Luiz Claudio Pereira Ribeiro pela confiança, incentivo, revisões e companheirismo;

... aos Professores Dr. Fernando Samuel Sion e Dr. Amilcar Tanuri pela estrutura, colaboração e confiança;

... ao Professor Luiz Artur Calheiros Leite pelo auxílio nas etapas iniciais do projeto;

... a todos que direta e indiretamente me ajudaram nesta pesquisa.

## RESUMO

### **Análise comparativa entre metodologias de sorodiagnóstico confirmatórias para HIV-2 em amostras de pacientes atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle entre os anos de 2000 até 2015**

Introdução: O diagnóstico de HIV dá-se, principalmente, pela detecção de anticorpos. O Teste Rápido (TR) *Imunoblot* de Bio-Manguinhos e o TR Geenius da Bio-rad são ensaios imunocromatográficos que utilizam proteínas de HIV-2, permitindo a diferenciação entre HIV-1 e HIV-2. Objetivo: Comparar a interpretação do diagnóstico de HIV-2 entre dois testes sorológicos confirmatórios para HIV-2. Metodologia: Trabalho realizado a partir de 633 amostras HIV reativas do biorrepositório do HUGG/UNIRIO dos anos de 2000 a 2015. Para tal análise, as amostras que apresentaram reatividade à proteína gp36 no TR Bio-Manguinhos foram submetidas à testagem no TR Geenius, através do procedimento de leitura automatizada e visual. A reação ao HIV-2 no TR Geenius é atribuída à detecção simultânea de gp36 e gp140 e no TR Bio-Manguinhos à reatividade à gp36, sendo necessárias etapas de diluições (1:10 e 1:100) para diferenciação entre os vírus, caso haja duas ou mais linhas correspondentes às proteínas de HIV-1. O diagnóstico definitivo de infecção pelo HIV-2 é emitido pelo Laboratório de Referência Nacional para HIV-2 com o uso de imunoensaio tipo-específico (pepEIE HIV-1/2). As análises comparativas de reatividade dos TR e da confiabilidade das leituras automatizada e visual foram realizadas pela estatística *Kappa* de *Cohen* e classificadas por Landis & Koch (1977), *Software* R. Resultados: Das 633 amostras avaliadas, 59 amostras não diluídas apresentaram reatividade cruzada ao HIV-2 no TR Bio-Manguinhos. A diluição 1:10 das amostras reduziu a 10 casos de reatividade à gp36 e a ausência de detecções foi obtida na diluição 1:100. No TR Geenius, 12 das 59 amostras demonstraram reatividade às proteínas de HIV-2 (10 para gp36 e 2 para gp140), mas sem detecção simultânea das duas proteínas. Os resultados dos TR foram concordantes na detecção de gp36 em 10 das 59 amostras não diluídas, coeficiente *Kappa* considerado ausente (<0,0). As interpretações visuais e automatizadas do TR Geenius mostraram uma concordância quase perfeita ( $k=0,89$ ) das bandas de HIV-2, discrepância sem interferência nos resultados. Todas as amostras foram não reativas para HIV-2 no pepEIE HIV-1/2. Conclusão: A reatividade cruzada ao HIV-2 foi

observada em 9,32% das amostras não diluídas analisadas no TR Bio-Manguinhos e em 12 das 59 amostras no TR Geenius. Ademais, a leitura visual apresenta concordância quase perfeita com a automatizada.

**Palavras-chave:** HIV-2, diagnóstico de HIV; testes confirmatórios HIV.

## ABSTRACT

### **Comparative analysis of confirmatory serodiagnostic methodologies for HIV-2 in samples of patients attended at the Hospital Universitário Gaffrée and Guinle from 2000 to 2015.**

Introduction: The diagnosis of HIV results mainly from the detection of antibodies. Bio-Manguinhos's Immunoblot Confirmatory Rapid Test (RT) HIV-1/2 and Bio-rad's Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay are immunochromatographic tests that utilize HIV-2 proteins, allowing a differentiation between HIV-1 and HIV-2. Objective: compare an interpretation of the diagnosis of HIV-2 in two confirmatory serological tests for HIV-2. METHODS: This study was conducted using 633 HIV reactive samples from the HUGG / UNIRIO biorepository from the years 2000 to 2015. For this analysis, the samples that showed reactivity to the protein gp36 in RT Bio-Manguinhos were submitted to RT Geenius testing, through automated and visual reading procedures. The reaction to HIV-2 in RT Geenius is attributed to the simultaneous detection of gp36 and gp140 and in TR Bio-Manguinhos to reactivity to gp36, requiring dilution steps (1:10 and 1: 100) for the differentiation of virus, in case there are two or more lines corresponding to the HIV-1 proteins. The definitive diagnosis of HIV-2 infection is issued by the National Reference Laboratory for HIV-2 with the use of the type-specific immunotest (pepEIE HIV-1/2). The comparative analyzes of the reactivity of the TR and the reliability of the automated and visual readings were performed according to Cohen's Kappa statistic and classified by Landis & Koch (1977), Software R. Results: Of the 633 samples evaluated, 59 non-diluted samples showed cross-reactivity to HIV-2 in TR Bio-Manguinhos. The 1:10 dilution of the samples resulted in 10 cases of reactivity to gp36, while an absence of detections was obtained with the 1: 100 dilution. In TR Geenius, 12 out of 59 samples showed reactivity to HIV-2 proteins (10 to gp36 and 2 to gp140), but without simultaneous detection of the two proteins. The results of the TR were concordant in the detection of gp36 in 10 of the 59 undiluted samples, with the Kappa coefficient considered absent ( $<0.0$ ). The visual and automated interpretations of TR Geenius showed an almost perfect concordance ( $k = 0.89$ ) of the HIV-2 bands, a discrepancy without interference in the results. All of the samples were non-reactive to HIV-2 in pepEIE HIV-1/2. Conclusion: Cross-reactivity to HIV-2 was

observed in 9.32% of the non-diluted samples analyzed in RT Bio-Manguinhos, and in 12 of the 59 in TR Geenius samples. In addition, the visual reading showed almost perfect concordance with the automated one.

Keywords: HIV-2, HIV diagnosis; Confirmatory HIV tests.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Classificação dos vírus HIV 1/2 .....	17
Figura 2	– Comparação entre as proteínas de HIV-1 e HIV-2.....	20
Figura 3	– Genomas dos vírus HIV-1 e HIV-2.....	20
Figura 4	– Marcadores sanguíneos da infecção pelo HIV.....	41
Figura 5	– Reatividade de cada metodologia de acordo com a progressão da infecção.....	42
Figura 6	– Dispositivo do TR DPP <i>Imunoblot</i> HIV 1/2.....	44
Figura 7	– Dispositivo TR DPP <i>Geenius</i> HIV 1/2.....	45
Figura 8	– Ensaio Imunoenzimático de 3ª Geração do tipo ELISA.....	47
Figura 9	– Ensaio Imunoenzimático de 4ª Geração do tipo ELISA.....	48
Figura 10	– Fluxo de processamento das amostras.....	55
Figura 11	– Interpretação de resultados do TR DPP HIV 1/2.....	56
Figura 12	– Interpretação dos resultados individuais TR <i>Geenius</i> HIV 1/2.....	57
Figura 13	– Critério de interpretação global HIV 1/2 TR <i>Geenius</i> HIV 1/2.....	58
Figura 14	– Proteínas virais e interpretação do ensaio <i>New Lav Blot I</i> , <i>Bio-Rad</i> .....	59
Figura 15	– Resultados da testagem de reatividade ao HIV.....	64

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Ensaio imunoenzimático empregado no diagnóstico de HIV nas 59 amostras GP36 reativas no HUGG/UNIRIO..... 65
- Tabela 2 – Reatividade às bandas de HIV-2 nos testes rápidos DPP *Imunoblot* Bio-Manguinhos HIV versus DPP Geenius HIV ..... 66
- Tabela 3 – Discordância entre os anticorpos detectados pelo TR Geenius HIV-1/2 nas leituras e interpretações visuais e automatizadas na amostra A15 ..... 67

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BCIP/NBT – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato e NitroBlue Tetrazolium

BSA – proteína albumina do soro bovino

CCR – co-receptores de quimiocinas

CD – *cluster of differentiation*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* ou Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CV – Carga Viral

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DDAHV – Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPP – Plataforma de Duplo Percurso

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

ELISA – Ensaio imunoenzimático

Env – Envelope

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration* ou agência de alimentos e medicamentos

Gag – Região genômica do grupo antigênico

GP – Glicoproteína

HAART – Terapia Antirretroviral Altamente Ativa

HIV – Vírus de Imunodeficiência Adquirida

HIV-1 – Vírus de Imunodeficiência Adquirida do Tipo 1

HIV-2 – Vírus de Imunodeficiência Adquirida do Tipo 2

HLA – Antígenos de Leucócitos Humanos

HUGG – Hospital Universitário Gaffrée e Guinle

IP – Inibidores de Protease

IST – Infecções Sexualmente Transmissíveis

LVM – Laboratório de Virologia Molecular

LTR – *Long terminal repeats* ou sequência de longas repetições terminais

LVM – Laboratório de Virologia Molecular

MHC-I – Complexo de Histocompatibilidade de Classe I

NNRTI – inibidores de RT não nucleosídeos

NRTI – inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMC – células mononucleares do sangue periférico

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – Reação de polimerase em cadeia

Pol – Polimerase

PR – Protease

RNA – Ácido Ribonucleico

SIV – Vírus de Imunodeficiência Símia

TMB – 3,3',5,5' base tetrametilbenzidina

TCD4<sup>+</sup> – Linfócito T da subpopulação CD4<sup>+</sup>

TCD8<sup>+</sup> – Linfócito T da subpopulação CD8<sup>+</sup>

TR – Teste Rápido

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNIRIO – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

WB – *Western blot*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Origem do HIV-2	15
1.2 Características Virais e Resposta Imune	19
1.3 História natural do HIV-2 e coinfeção com HIV-1	23
1.4 Transmissão Viral	27
1.5 Manifestações Clínicas	28
1.6 Acompanhamento Terapêutico	29
1.7 Epidemiologia do HIV-2 no Mundo	32
1.7.1 Epidemiologia do HIV-2 no Brasil	39
1.8 Testagem e Diagnóstico viral	40
1.8.1 Teste rápido <i>Imunoblot</i> Bio-Manguinhos e Teste rápido Geenius	43
1.8.2 <i>Western Blot</i>	46
1.8.3 Ensaio imunoenzimáticos	46
1.8.4 Diagnóstico da infecção pelo HIV-2	48
1.8.5 Recomendações para diagnóstico do HIV-2 no Brasil	50
2 OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo geral	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 JUSTIFICATIVA	53
4 METODOLOGIA	54
4.1 Desenho do estudo	54
4.2 Testes sorológicos para o HIV-2	54
4.2.1 Procedimento de testagem com TR DPP <i>Imunoblot</i> HIV 1/2 de Bio-Manguinhos	55
4.2.2 Procedimento de testagem com TR Geenius HIV e Software Geenius	56
4.2.3 Procedimento de testagem <i>New Lav Blot I</i> , Bio-Rad	58
4.2.4 Ensaio imunoenzimático (pepEIE) HIV-1/2 LVM	59
4.3 Coleta e análise estatística dos dados	61
4.4 Considerações éticas e orçamentárias	62
5 RESULTADOS	63
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) constituem graves problemas de saúde pública no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde o início da epidemia (1980), mais de 70 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV e cerca de 35 milhões morreram em decorrência da infecção. Cerca de 36,7 milhões de pessoas viviam com HIV no final de 2015 em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

O Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DDAHV) estimou que desde o início da epidemia de AIDS (1980) no Brasil até junho de 2015 foram registrados no país 798.366 casos, com média anual de 40,6 mil ocorrências nos últimos registros. Atualmente, a distribuição de ocorrências abrange todo o território nacional.

Desde o início da epidemia de HIV/AIDS no Brasil até dezembro de 2014 foram identificados 290.929 óbitos, a maioria na região Sudeste (61,0%) (BRASIL, 2015).

Os agentes etiológicos responsáveis pela AIDS são o HIV do tipo 1 (HIV-1) e do tipo 2 (HIV-2). Enquanto o primeiro é responsável pela pandemia global, o HIV-2 apresenta expressivo papel como causador da doença em certas regiões do mundo, principalmente na África Ocidental, embora, com a intensa integração global, tenha havido um aumento no registro de ocorrências nos últimos anos na Europa, Índia, Estados Unidos e demais países com vínculos socioeconômicos com as regiões africanas endêmicas para a infecção pelo HIV-2 (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

O HIV-1 e o HIV-2 apresentam similaridades clínicas, uma vez estabelecida a AIDS, e têm vias de transmissão semelhantes. Apesar disso, as dinâmicas clínico-biológicas das infecções são distintas em relação à patogenicidade e à progressão para AIDS (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

## 1.1 Origem do HIV-2

O HIV-1 e o HIV-2 apresentam circunstâncias de origem e evolução distintas, mas que convergiram para a pandemia de AIDS. Tal enfermidade foi reconhecida em 1981 pelo aumento de infecções oportunistas e malignas raras em homens jovens homossexuais e um retrovírus foi posteriormente identificado como agente causador principal da patologia e denominado HIV-1 (SHARP; HAHN, 2011).

Em 1985, identificou-se no Senegal um grupo de indivíduos com a presença de anticorpos que reagiam mais fortemente (maior avidéz) ao vírus de imunodeficiência símia (SIV) do que HIV-1. Esse novo retrovírus foi isolado e, em 1986, denominado HIV-2. Embora os dois vírus pertençam à subfamília *Orthoretrovirinae* e apresentem semelhanças na organização genômica, o HIV-2 é somente 40% similar ao HIV-1 na sequência de nucleotídeos e cerca de 75% similar ao SIV (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

O HIV pertence ao gênero *Lentivirus* e família *Retroviridae*. É uma partícula esférica que mede entre 100 a 120 nm de diâmetro e apresenta em seu núcleo duas cópias de RNA (ácido ribonucleico) de cadeia simples, encapsuladas por uma camada proteica ou nucleocapsídeo, capsídeo e um envelope externo de bicamada fosfolipídica (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Atribuiu-se ao HIV-2 uma relação remota com o HIV-1 e uma maior proximidade com os vírus símios causadores de imunodeficiência em macacos cativos, encontrados em diferentes primatas da África subsaariana. Foram denominados genericamente como SIVs, cujos sufixos estão ligados a suas espécies de origem, como SIVsmm (*sooty mangabey*), SIVcpz (chimpanzés), dentre outros (SHARP; HAHN, 2011).

No período de descoberta da relação entre esses vírus, análises sorológicas evidenciaram a similaridade proteica entre HIV-2 e o SIV por meio de ensaios de imunoprecipitação com anticorpos de pacientes HIV-2 que capturaram todas as proteínas do SIV (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Os macacos do Velho Mundo são naturalmente infectados com mais de 40 diferentes lentivirus (SIVs), vírus largamente não patogênicos em seus hospedeiros naturais. Diversos desses vírus conseguiram, evolutivamente, cruzar as barreiras das espécies e os fatores de restrição dos hospedeiros, gerando “novos patógenos” (versões mutadas do agente original) em primatas humanos e não-humanos.

Pela proximidade filogenética, as relações símias mais próximas ao HIV-1 e HIV-2 são, respectivamente, com os vírus encontrados no chimpanzé (SIVcpz) e no *sooty mangabey* (SIVsmm). Portanto, atualmente é consenso que HIV-1 e HIV-2 foram resultantes de transferências zoonóticas de vírus de primatas africanos e cada grupo de HIV-2 (A a H) representa um evento distinto (SHARP; HAHN, 2011).

A origem zoonótica do HIV-2 foi proposta pela primeira vez em 1989 (HIRSCH et al., 1989) e, posteriormente, confirmada pela demonstração de que seres humanos habitantes da África Ocidental albergavam estirpes de HIV-2 que se assemelhavam ao vírus símio. O SIVsmm é encontrado tanto em primatas de cativeiros como em selvagens e apresenta alta taxa de incidência nas fêmeas, o que sugere que a infecção não tem efeito negativo no sucesso e comportamento reprodutivo, além de não ser patogênico no seu hospedeiro natural (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Alguns aspectos que evidenciam a transmissão de SIV para humanos são a alta similaridade da estrutura genômica, incluindo a presença do gene acessório *vpx* (gene exclusivo do HIV-2 e do SIV); a proximidade filogenética, o HIV-2 e SIVsmm isolados da mesma área apresentam uma maior proximidade do que SIVsmm isolados de regiões distintas. A coincidência geográfica também é relevante na transmissão dessa zoonose, uma vez que os mangabeis são encontrados na África Ocidental onde houve uma alta taxa de prevalência de infecções por HIV-2 (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

A existência de rotas plausíveis de transmissão também corroboram essa zoonose, já que o contato com tecidos e fluídos corporais contaminados durante caça, através de mordidas e outros ferimentos causados pelos animais, e nos processos de manipulação rudimentares são frequentes (BOCK; MARKOVITZ, 2001). Apetrei et al. (2005) demonstraram que sete de 12 amostras de carnes de caças de mangabeis vendidas no comércio da África Ocidental estavam infectadas com SIV. Adicionalmente, macacos órfãos são frequentemente mantidos como animais de estimação e um estudo, entre 1988 e 1989, demonstrou que dois dos 25 macacos domesticados analisados eram portadores de SIVsmm, uma potencial rota potencial de transmissão do vírus (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

O HIV-2 exibe uma considerável diversidade genética, pois pelo menos oito linhagens distintas de HIV-2 foram identificadas desde seu primeiro isolamento e cada uma representa um evento independente de transmissão zoonótica. O HIV-1 é subdividido em quatro grupos (M, N, O e P), sendo a maioria das infecções causadas

pelo grupo M, que ainda é diferenciado nos subtipos A (agrupam A1, A2, A3, A4 e A5), B, C, D, F (F1 e F2), G, H, J e K, além das formas recombinantes que resultam de infecções mistas de vírus de linhagens diferentes (Figura 1) (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008; FERREIRA-JUNIOR et al., 2014; GAO et al., 1992).

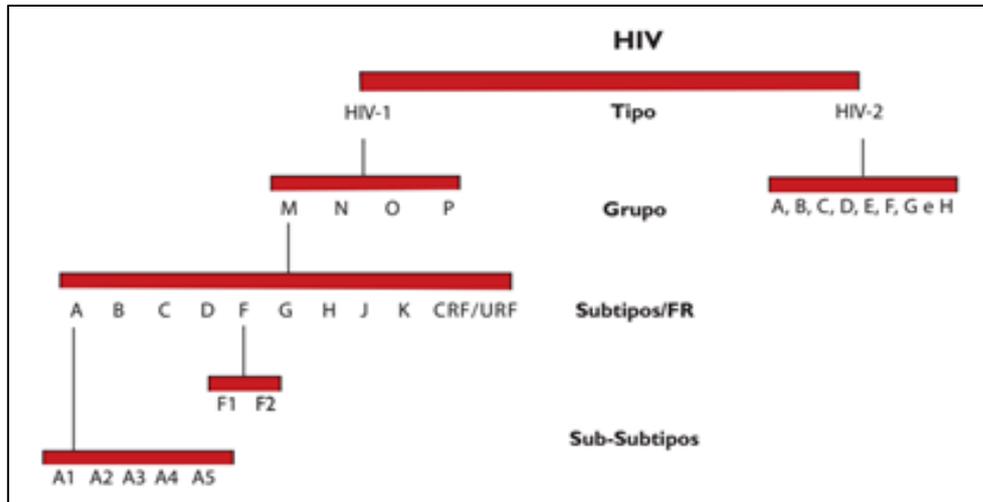


FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS VÍRUS HIV 1/2

FONTE: Ferreira-Junior et al., 2014

Por analogia ao HIV-1, as linhagens de HIV-2 foram denominadas em grupos de A a H, embora o grupo A, encontrado em toda a África Ocidental, e o B, que predomina na Costa do Marfim, representem os grupos de HIV-2 de maior disseminação. Entre as 13 sequências completas disponíveis, 10 são do subtipo A e três do subtipo B (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008; FERREIRA-JUNIOR et al., 2014; GAO et al., 1992).

Os demais grupos foram identificados em casos individuais e limitados, sem propagação secundária registrada. Nestes casos, apenas as sequências virais parciais das regiões *gag*, *pol*, *env* e de longas repetições terminais (LTR) estão disponíveis. Não há diferenças significativas na progressão da doença, patogenicidade ou transmissão entre os grupos A e B de HIV-2 e os demais grupos que representam infecções únicas, fato que dificulta a identificação de diferenças significativas (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008; FERREIRA-JUNIOR et al., 2014; GAO et al., 1992).

De acordo com a reconstrução filogenética elaborada por Lemey et al. (2003), a estimativa de entrada do grupo A de HIV-2 na espécie humana foi por volta de 1940 ± 16 anos, aproximadamente uma década após a introdução do HIV-1 na população

humana. Enquanto isso, o ancestral comum do grupo B de HIV-2 foi datado de  $1945 \pm 14$  anos, grupo com maior reatividade cruzada com os antígenos de *env* (envelope) do HIV-1, algo que reflete no diagnóstico sorológico.

A investigação do histórico epidemiológico do grupo A baseada no sequenciamento de *gag* (nucleocapsídeo), *pol* (polimerase-protease) e *env* (envelope) em amostras da população rural de Guiné-Bissau, região na qual esse subtipo desempenha principal contribuição para a epidemia do HIV-2, indicou um aumento exponencial da infecção no período de 1950 a 1970 nesse local. Tal período é coincidente com a época da guerra de independência (1963-1974) da, até então, colônia portuguesa (LEMEY et al., 2003).

Tal implicação político-social desempenhou um papel relevante na disseminação da infecção no território africano e português, por transmissão sexual, transfusão sanguínea, uso de seringas não estéreis e outras vias. Os dados dessa pesquisa estão relacionados à epidemiologia do grupo A de HIV-2 na população rural de Guiné-Bissau, a partir de amostras dos indivíduos reativos para HIV-2, e evolução viral local, não sendo viável a extrapolação dessas estimativas para a epidemia de HIV-2 como um todo (LEMEY et al., 2003).

Dos grupos de natureza esporádica, os grupos C, G e H foram ligados a estirpes SIVsmm da Costa do Marfim. O grupo D é mais estreitamente relacionado com uma cepa SIVsmm da Libéria e os grupos E e F se assemelham a estirpes SIVsmm da Serra Leoa (GAO et al., 1992; CHEN et al., 1996; SANTIAGO et al., 2005).

Smith et al. (2008) identificaram outro vírus em Nova Jersey em um imigrante oriundo da mesma região geográfica de Serra Leoa, alocado no grupo F. Nesse estudo, o paciente foi identificado com uma contagem de TCD4+ reduzida e elevadas cargas virais, perfil contrário aos casos típicos da doença pelo HIV-2. Não é claro se os dois vírus do grupo F representam transmissões de mangabeis independentes entre si ou as diferenças encontradas são reflexos da passagem para os hospedeiros humanos.

Ayoubaa et al. (2013) identificaram em um menino de 8 anos que manipulava e consumia carne de primatas selvagens, na zona rural da Costa do Marfim, uma nova transmissão de SIV para humanos, uma variante não relacionada aos grupos previamente definidos de HIV-2, mas ainda não completamente caracterizada.

Portanto, os grupos de HIV-1 e HIV-2 representam eventos de transmissão independentes de SIV infectantes de primatas não-humanos da África para humanos,

ocorrendo apenas um evento de transmissão que envolveu o SIVcpz de chimpanzés do sudeste de Camarões para originar o HIV-1 do grupo M, principal causador da pandemia de AIDS. Além disso, dois aparentes eventos entre SIVsmm de mangabeis foram necessários para o surgimento dos grupos A e B de HIV-2 (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Os seres humanos são expostos permanentemente a uma ampla variedade de SIV em certas regiões do mundo e trabalhos recentes mostram que SIVs continuam sendo transmitidos para humanos (BOCK; MARKOVITZ, 2001), havendo o risco de novos surtos de zoonoses. Tais fatos lançam luz na problemática das interações zoonóticas entre espécies e as implicações para a saúde pública.

## 1.2 Características Virais e Resposta Imune

O período entre a infecção e o surgimento da AIDS é, em geral, mais longo na patologia causada pelo HIV-2 do que pelo HIV-1. Essa diferença é causada em parte pelas menores cargas virais intrínsecas à infecção pelo HIV-2, sendo a viremia um importante determinante na progressão para AIDS (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Embora as infecções por HIV-1 e HIV-2 levem a níveis semelhantes de latência (células infectadas não produtoras de partículas virais), a replicação viral é acentuadamente menor na infecção pelo HIV-2 do que pelo HIV-1, devido às diferenças nas dinâmicas transcricionais dos dois vírus, e quantitativamente mais efetiva no HIV-1 (BOCK; MARKOVITZ, 2001). Estudos demonstram também que a taxa de apoptose de células T é menor na infecção com o HIV-2 em comparação ao HIV-1.

Na infecção com HIV-1, a produção de novas células T não compensa o ritmo de perda por apoptose, motivo pelo qual a função do timo fica prejudicada. Em contrapartida, a apoptose de células T é reduzida na infecção pelo HIV-2, sendo menos acentuada em indivíduos com sintomatologia branda (SOUSA et al., 2002). Logo, a menor patogenicidade ligada ao HIV-2 pode ser associada tanto a menores cargas virais plasmáticas como ao menor grau de apoptose da célula-alvo de infecção.

O HIV-2 codifica os mesmos produtos que HIV-1, apesar das diferenças na composição de aminoácidos e no peso molecular. Todos os retrovírus, inclusos HIV-1, HIV-2 e SIV, codificam genes *gag*, *pol* e *env* (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

O gene *env* varia consideravelmente entre os retrovírus. Em HIV-2, a

expressão do gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope gp105 e a glicoproteína transmembrana gp36, derivadas da precursora gp140. O gene *gag* codifica as proteínas do nucleocapsídeo p56, p26 e da matriz p16 (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Entre as proteínas codificadas pelo gene *pol* está a p68, da qual se originam p53 (transcriptase reversa), p10 (protease) e p34 (integrase) (Figura 2). Os genes *gag* e *pol* são bem conservados no HIV-1 e HIV-2 e responsáveis pela reatividade cruzada observada em ensaios imunoenzimáticos para HIV-1 (ROMIEU et al., 1990).

Genes do HIV	Produtos do HIV	Peso Molecular das Proteínas e Glicoproteínas Virais	
		HIV-1	HIV-2
<i>Env</i>	Precursor	gp160	gp140
	Glicoproteína externa	gp120	gp105/125
	Glicoproteína transmembranar	gp41	gp36
<i>Pol</i>	Transcriptase Reversa	p66	p68
	Transcriptase Reversa	p51	p53
	Integrase	p31	p31/34
	Protease	p10	p10
<i>Gag</i>	Precursor	p55	p56
	Capsídeo	p24	p26
	Matriz	p17	p16

FIGURA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DE HIV-1 E HIV-2

FONTE: Ferreira-Junior et al., 2014

Além dos genes *gag*, *pol* e *env*, HIV-1, HIV-2 e SIV contêm genes que expressam *nef*, *vif*, *tat*, *vpr* e *rev* (Figura 3). Enquanto o genoma do HIV-1 apresenta *vpu*, HIV-2 e SIV possuem o gene adicional *vpx* (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

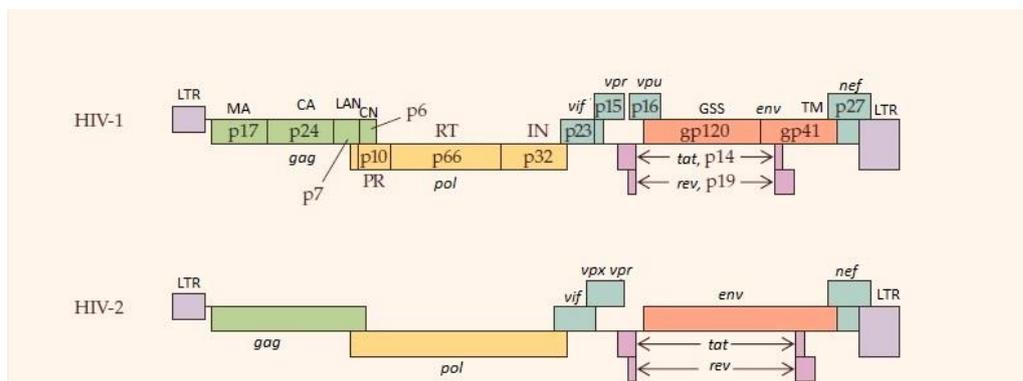


FIGURA 3 – GENOMAS DOS VÍRUS HIV-1 E HIV-2

FONTE: Hoffmann e Gallant, 2007

O gene *vpu* interfere na expressão de receptores CD4 na membrana plasmática através de seu sequestro ainda no retículo endoplasmático, conduzindo-o

para a degradação – mecanismo que protege a célula contra reinfecções e possibilita o completo amadurecimento das partículas virais. Adicionalmente, o produto do gene *vpu* também atua no aumento da liberação de partículas virais por mecanismos independentes da degradação do TCD4<sup>+</sup> e estudos demonstram que interfere na biossíntese do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Pelas similaridades em suas sequências genéticas, *vpu* do HIV-1 e *vpr* do HIV-2 surgiram a partir de um ancestral comum, entretanto, funcionalmente apresentam distinções nas células infectadas. Em comum, os produtos desses genes são necessários para uma eficaz importação nuclear do complexo viral de pré-integração. Estudos demonstraram que são mais requisitados para uma eficiente infecção em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e macrófagos do que em linhagens de células T ou PBMC pré-ativados (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Além disso, a comparação genética entre os HIV-1 e o HIV-2 revela uma diferença significativa na sequência de aminoácidos em diferentes regiões do genoma. Os dois vírus compartilham apenas 60% da sequência de aminoácido para a região inteira do gene *pol* e 30-40% na região codificante de *env*. Apesar das diferenças genéticas, as proteínas codificadas pelo gene da transcriptase reversa do HIV-1 e HIV-2 são similares em suas estruturas e funcionalidades (ROMIEU et al., 1990).

Assim como o HIV-1, o HIV-2 faz uso do receptor principal das células TCD4<sup>+</sup> e de co-receptores de quimiocinas (CCR5, CXCR4 e CCR3) para a infecção das células-alvo. O HIV-2, distintamente do HIV-1, parece ser mais flexível no uso de co-receptores ao utilizar de forma dominante CCR-5 e CXCR4 e, alternativamente, CCR-11, CCR-2b, CCR-3, CCR-8, V28, BOB/GPR15, Bonzo/STRL33, APJ e V528 para qualquer infecção, apesar da menor patogenicidade. O SIV utiliza preferencialmente CCR5 e CXCR4 (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Com relação à resposta imunológica do hospedeiro, estudos comparativos da resposta TCD4<sup>+</sup> específica de pacientes HIV-2 mostram um menor perfil de diferenciação, mantendo uma capacidade proliferativa maior quando comparada ao contexto da infecção por HIV-1. Já a resposta TCD8<sup>+</sup> específica para HIV-2 é maior em magnitude e polifuncionalmente mais robusta à observada em pessoas infectadas por HIV-1 (DUVALL et al., 2006).

Em se tratando da resposta de células B, há uma maior amplitude na produção de anticorpos neutralizantes na infecção pelo HIV-2 do que na associada ao

HIV-1. Isso ocorre não somente pela diversidade viral e capacidade de escape da neutralização, mas possivelmente por propriedades intrínsecas aos antígenos de HIV-2 (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

Há um menor número de sítios de glicosilação N-terminais no HIV-2 em comparação ao HIV-1. Isso resulta em um domínio V3 do envelope de HIV-2 mais exposto que leva a uma variação na sensibilidade a ação neutralizante entre os grupos de HIV-2 (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

A infecção pelo HIV é caracterizada por uma disfunção imunológica acompanhada por infecções oportunistas e neoplasias que podem culminar na morte do hospedeiro. A deficiência funcional no sistema imune, paradoxalmente, é seguida por uma ativação imunológica sistêmica, verificada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e no "turnover" de células T (morte celular e produção de novas células) até um ponto de colapso na capacidade regenerativa, em um contexto de fluxo natural da infecção (LELIGDOWICZ et al., 2010).

A infecção pelo SIVsmm em seu hospedeiro natural, *sooty mangabey*, conduz a uma viremia alta sem um quadro de imunossupressão ou progressão da doença, sendo associado a uma regulada ativação imunológica, fato que abre margem para o papel da ativação e os mecanismos de resposta do hospedeiro frente à infecção viral. A ativação imune pode ser monitorada pela expressão do marcador CD38 e Antígeno Leucocitário Humano (HLA-DR) em TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> ou pela quantificação de fatores solúveis, como  $\beta$ -microglobulinas, servindo como indicadores de prognóstico da doença (SOUSA et al., 2002).

Embora alguns trabalhos indiquem uma ativação sistêmica imunológica menor em pacientes infectados por HIV-2 do que em pacientes HIV-1 (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008), outros estudos apontam uma ativação imune similar em indivíduos HIV-1 e HIV-2 reativos estratificados pela contagem de TCD4<sup>+</sup>, embora a carga viral (CV) plasmática seja menor no grupo infectado com HIV-2 com faixa de TCD4<sup>+</sup> dentro da faixa de normalidade (>500 células/mm<sup>3</sup>) (SOUSA et al., 2002). Uma possível explicação para esse cenário seria o papel das células de memória na manutenção do "estado de ativação", funcionando como um reservatório viral e focos de novas disseminações virais.

A infecção moderada pode ser atribuída a menor replicação viral e também a mecanismos de controle imune do hospedeiro aprimorado. Apesar disso, estudos com culturas de linfócitos frente à infecção com HIV-1 e HIV-2 não apresentam diferenças

nos efeitos citopáticos (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

Já as dinâmicas virais *in vivo* são diferenciadas. É observado um padrão contrastante de provírus e CV plasmática na infecção pelo HIV-1 e HIV-2, enquanto os níveis de provírus entre os dois vírus são correspondentes, indicando que ambos possuem capacidades replicativas, os níveis de RNAm viral acumulado são menores na infecção pelo HIV-2, sugerindo diferenças no controle transcricional do material genético viral (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

A falta de uma pandemia de HIV-2 pode ser atribuída à menor transmissão secundária diretamente relacionada a uma menor CV plasmática (circulante). Isso é resultante de um balanço entre capacidade replicativa e o *clearance* viral (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

Assim, após a infecção, a expressão do HIV na célula hospedeira pode ocorrer em um período variável de tempo, de acordo com as diferenças nas atividades transcricionais e nas condições ambientais (celulares) que possibilitam a replicação viral. Esses fatores resultam em distintos perfis de progressão da infecção por HIV-1 estes dois vírus.

### **1.3 História natural do HIV-2 e coinfeção com HIV-1**

O perfil de infecção pelo HIV-2 apresenta uma longa fase assintomática e uma progressão lenta para AIDS, com um perfil variável de acordo com características imunológicas do hospedeiro e aspectos virais. Na zona rural de Guiné-Bissau, dois perfis nítidos de pacientes infectados por HIV-2 foram descritos: os progressores indistinguíveis daqueles com infecção pelo HIV-1 e os não-progressores de HIV-2 (86% a 95% das pessoas infectadas com HIV-2), que permanecem com CV indetectável por 10 a 15 anos de infecção e com expectativa de vida normal (VAN DER LOEFF et al., 2010).

Em uma coorte de mulheres profissionais do sexo de Senegal, a probabilidade de sobrevivência cinco anos após a soroconversão foi de 100% em pacientes HIV-2, comparada a 67% em pacientes HIV-1 (MARLINK, R. et al, 1994). Alguns pacientes HIV-2 reativos do estudo desenvolveram avançada imunodeficiência e complicações relacionadas à AIDS, assim como na infecção pelo HIV-1, enquanto outros tiveram sobrevivência normal ou progressão lenta.

O HIV-2, pelas características virais, é menos virulento que o HIV-1. A partir

disso foi proposta a hipótese de que uma infecção “prévia” (anterior) com HIV-2 funcionaria como uma forma de imunidade adquirida (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Um estudo com profissionais do sexo sugeriu pela primeira vez o conceito de efeito protetor da infecção por HIV-2 contra a aquisição posterior de HIV-1. Travers et al. (1995) identificaram, em um grupo de seis profissionais do sexo em Senegal infectados por HIV-2, uma taxa de incidência do HIV-1 no valor de 2,53 no grupo controle não infectado e 1,06 no grupo HIV-2 reativo, mesmo a incidência de gonorreia (usada no estudo como marcador de atividade sexual e indicativo de doenças sexualmente transmissíveis) sendo significativamente maior no grupo HIV-2 reativo.

As diferenças nas cargas virais dos grupos analisados não ficam evidentes no trabalho acadêmico em comento. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que PBMC de indivíduos infectados com HIV-2, *in vitro*, apresentaram resistência ao HIV-1, possivelmente por um mecanismo mediado por  $\beta$ -quimiocinas (TRAVERS et al., 1995).

Esbjörnsson et al. (2012) analisaram 223 casos de sorologias reativas para HIV (191 monoinfectados por HIV-1 e 32 coinfectedo HIV-1/HIV-2), por um período de acompanhamento de aproximadamente 20 anos em Guiné-Bissau, e reportaram um tempo de sobrevivência (menor mortalidade) mais longo (cerca de 42% maior) em indivíduos coinfectedos, nos quais a infecção com HIV-2 precedia a do HIV-1, sendo feitos os ajustes nas assimetrias de idade entre os grupos. Guiné-Bissau é o país com maior documentação de infecções pelo HIV-2 e taxa de prevalência de 8% entre adultos.

O mesmo grupo realizou um estudo posterior (ESBJÖRNSSO et al., 2014) no qual reportou um tempo significativamente maior para progressão da AIDS em indivíduos infectados por HIV-2 antes da aquisição do HIV-1, período médio de 104 meses. Em comparação, a média foi de 68 meses para os que adquiriram HIV-1 na ausência de HIV-2.

A generalização dessas descobertas foi questionada em estudos posteriores desenvolvidos na Costa do Marfim, Guiné-Bissau e Gambia. Prince et al. (2014) fizeram uma metanálise da literatura através da triagem de sete estudos desenvolvidos no Oeste da África e não encontraram evidências de uma progressão mais lenta para AIDS e diferenças nas taxas de mortalidade de pacientes duplo infectados em comparação aos infectados somente com HIV-1, sejam indivíduos em

estágios iniciais ou avançados da doença.

Possíveis explicações para as discrepâncias vistas nos estudos anteriormente mencionados são (i) desenhos metodológicos com tempos de observação distintos; (ii) a diversidade genética populacional presente nas regiões africanas em que os estudos foram desenvolvidos e seus consequentes efeitos sobre a resposta à infecção por HIV-1 e HIV-2; (iii) datas presumíveis de soroconversão que conduzem a erros de interpretação nos níveis de queda da população de TCD4+; (iv) variação na proporção de homens e mulheres selecionados, abrindo margem a possíveis especulações do efeito do sexo nos resultados díspares (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014; MEDINA et al., 2016).

Embora o diagnóstico do ácido desoxirribonucleico (DNA) proviral pela *polimerase chain reaction* (PCR) seja mais sensível e tipo-específico, métodos de detecção distintos foram empregados nos trabalhos supracitados. Tais métodos poderiam alterar a classificação de mono infectados por HIV-1 para dupla reatividade a HIV-1 e HIV-2 nos trabalhos que utilizaram somente metodologias sorológicas (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014).

Apesar das controvérsias em torno do efeito protetor da infecção pelo HIV-2 precedida à exposição ao HIV-1, mecanismos biológicos possivelmente envolvidos estão sendo explorados. Estudos apontam que a ativação da proteína *tat* de HIV-2 inibe, por competição ou requisição de fatores celulares cruciais, a transativação e replicação do HIV-1 (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014).

A resposta imunológica também pode estar envolvida nessa inibição, tendo em vista que a maioria dos indivíduos HIV-2 reativos possuem células T citotóxicas reativas a epítomos de *gag* e outras proteínas de HIV-1 conservadas e similares as do HIV-2. Estudos demonstraram que linfócitos retirados do sangue periférico de profissionais do sexo reativas para HIV-2 apresentam cinquenta vezes maior resistência que o controle frente ao desafio com HIV-1 Bal (vírus com tropismo CCR5), embora a resistência ao HIV-1 MN (vírus que utiliza o correceptor CXCR4) tenha apresentado resultados menores e estatisticamente não significativos (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Perfil de resposta semelhante ao HIV-1 com tropismo pelos correceptores CCR5 ou CXCR4 foi observado em PBMC em outro estudo similar. Nesses estudos anteriormente citados, a depleção das células TCD8+ ou  $\beta$ -quimiocinas reduziu a resistência ao HIV-1 (BOCK; MARKOVITZ, 2001), apontando para um possível efeito

de HIV-2 na expressão de  $\beta$ -quimiocinas nos linfócitos infectados e, conseqüentemente, levando à inibição da infecção por HIV-1 com tropismo por CCR5.

Além disso, no contexto da infecção por HIV-2 há uma grande resposta citotóxica de linfócitos acompanhada da produção de granzimas e efeitos na expressão de receptores CCR5 em TCD4+. Isso reduz os alvos para HIV-1 e HIV-2 e, conseqüentemente, a susceptibilidade à infecção (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014).

Logo, a progressão mais atenuada vista em situações de indivíduos reativos para HIV-1 e HIV-2, primeiramente infectados por HIV-2, possibilitaria um quadro de ativação de mecanismos imunes de controle de HIV-2. As respostas de TCD8+ e TCD4+ específicas para *gag* teriam papéis possivelmente importantes, uma vez que intensas reações cruzadas entre anticorpos HIV-1/HIV-2 contra regiões conservadas de *gag* têm sido demonstradas (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014).

Portanto, esse direcionamento da resposta imune contra regiões conservadas e similares entre os dois vírus, causada pela prévia infecção com HIV-2, contribuiria para o controle da replicação do HIV-1 e da progressão da doença. Isso também se justificaria, em parte, porque uma diminuição no fenótipo da doença não é vista em uma situação de infecção por HIV-1 antes da infecção por HIV-2 (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014).

A infecção pelo HIV-2 gera uma potente resposta de anticorpos neutralizantes e, por isso, são plausíveis reações cruzadas com HIV-1. Não obstante, estudos apontam que a neutralização do HIV-1 é menos potente e a atividade neutralizante não reflete no *status* clínico (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

Dada a divergência entre os estudos, a infecção pelo HIV-2 pode não fornecer uma proteção absoluta contra infecções subseqüentes por HIV-1, não sendo considerada uma “vacina natural”. Entretanto, é plausível que a infecção por HIV-2 leve, em alguns indivíduos, a uma reação imune cruzada e afete a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e progressão da doença (DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008).

Estudos virológicos e imunológicos das últimas três décadas corroboram e analisam o fenótipo atenuado ou não progressores dos indivíduos infectados pelo HIV-2. Não obstante, permanece o interesse no melhor entendimento da dinâmica estabelecida pelos dois vírus correlacionada com a imunidade protetora do HIV-2 frente ao HIV-1 e seu reflexo na imunopatogenicidade do HIV-1 (KANKI; ROWLAND-JONES, 2014).

No Oeste da África, as duplas infecções com HIV-1 e HIV-2 tiveram uma prevalência entre os pacientes clínicos de 0,9% em 2003 e no Senegal ocorreram oscilações da prevalência dentre os profissionais do sexo, de 0,2% em 1985 para 3,2% em 1995, culminando em uma redução para 1,8% em 2003 (PRINCE et al., 2014). Essa prevalência diminuiu paulatinamente ao longo dos últimos 30 anos e, com isso, perde-se a oportunidade de mais estudos *in vivo* que poderiam fornecer evidências de mecanismos cruciais para a patogenicidade do vírus HIV em geral.

#### 1.4 Transmissão Viral

A capacidade de o HIV infectar um indivíduo está relacionada a fatores biológicos, como a concentração no fluido biológico (inóculo viral); integridade da mucosa envolvida (mucosa anal, vaginal ou oral); duração da exposição; tipo de amostra viral transmitida; *background* genético. Além disso, também a fatores comportamentais, como, por exemplo, indivíduos com múltiplos parceiros sexuais, o não uso de preservativo e o compartilhamento de seringas e/ou objetos perfurocortantes contaminados (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Os modos de transmissão do HIV-2 são semelhantes aos do HIV-1, isto é, são propagados por via sexual; parenteral (receptores de sangue ou hemoderivados, usuários de drogas injetáveis); transmissão materna durante a gestação (infecção congênita), parto (infecção perinatal), aleitamento (infecção pós-natal) (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Inicialmente, acreditava-se que a transmissão do HIV-2 diferia da propagação do HIV-1 em alguns aspectos, o primeiro deles dizia respeito à taxa de transmissão. Estudos indicavam que o HIV-2 era menos facilmente transmitido por contato sexual heterossexual do que HIV-1 (cinco vezes menos), sendo as taxas de prevalência da infecção pelo HIV-2 acrescidas com o aumento da idade em homens e mulheres (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Sankalé et al. (1998) analisaram as variantes virais no sangue e em amostras celulares cervicais de mulheres HIV-1 e HIV-2 reativos. As taxas de excreção viral foram 36,4% para HIV-1 e 16% para HIV-2, inferindo uma taxa de transmissão do HIV-2 inferior a do HIV-1 em relações heterossexuais.

Em uma coorte prospectivo de 613 mulheres grávidas para análise da transmissão de HIV na Costa do Marfim, entre 1990 e 1992, a taxa de transmissão

perinatal do HIV foi de 1,2% para HIV-2 e 24,7% para HIV-1 (ADJORLOLO-JOHNSON et al, 1994).

Em um estudo desenvolvido em Gâmbia com mulheres grávidas HIV-1 reativas, HIV-2 reativas e um grupo soronegativo, a CV média pré-natal das 94 mulheres infectadas por HIV-1 foi de 15.100 cópias/mL, superior 37 vezes a CV das 60 mulheres infectadas pelo HIV-2 (410 cópias/mL). Tal fato demonstrou o papel significativo da CV como fator de risco na transmissão viral vertical (O'DONOVAN et al., 2000).

Uma vez realizados os ajustes e estabelecendo níveis semelhantes de cargas virais para os dois vírus, a possibilidade de transmissão do HIV-1 e HIV-2 são similares (BOCK; MARKOVITZ, 2001). Logo, em todos os estudos anteriormente mencionados, a menor infectividade vista no HIV-2 pode ser relacionada a cargas virais tipicamente menores em pacientes infectados por esse vírus.

### **1.5 Manifestações Clínicas**

Apesar da progressão mais lenta para AIDS, uma vez nesse quadro, a sintomatologia e doenças oportunistas associadas em pessoas com HIV-2 é similar às comumente associadas o HIV-1, em adultos e crianças. Tais doenças incluem linfadenopatia generalizada, candidíase, pneumonia bacteriana recorrente e outras doenças pulmonares, dermatite pruriginosa generalizada, perda de peso superior a 10% do peso corporal, diarreia ou febre persistentes. Pessoas infectadas com HIV-2 frequentemente apresentam febre, diarreia e/ou candidíase oral durante o período de conversão (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

As principais causas de morte dentre pacientes com AIDS/HIV-2 são bacteremia/septicemia, toxoplasmose cerebral, caquexia, meningoencefalite e infiltrações pulmonares de etiologia não diagnosticada. Diferente do HIV-1, o HIV-2 não aparece com uma alta taxa de associação com tuberculose (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

O Sarcoma de Kaposi foi uma neoplasia comum em pacientes com AIDS nos EUA antes da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) e, ainda hoje, é uma doença endêmica na África Oriental e Central. Entretanto, a associação entre Sarcoma de Kaposi e HIV-2 ainda não foi consistentemente demonstrada (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

## 1.6 Acompanhamento Terapêutico

A falta de estudos clínicos randomizados controlados ou observacionais que forneçam uma base sólida para orientar a tomada de decisões para o tratamento da infecção pelo HIV-2 e progressão da doença acarretam dificuldades na escolha de esquemas terapêuticos adequados (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Alguns fatores devem ser considerados na escolha e no momento de início dos antirretrovirais em pacientes infectados por HIV-2: 1) a maioria dos indivíduos infectados por HIV-2 são não-progressores de longo-prazo; 2) devido a características genéticas intrínsecas, o vírus HIV-2 pode apresentar maior resistência a certos agentes antirretrovirais do que o HIV-1 e os caminhos para o desenvolvimento de mutações a drogas variam entre os dois vírus; 3) as cargas virais plasmáticas menores levam a um menor risco de transmissão do HIV-2. Postas essas variáveis, os clínicos e os pacientes devem tomar a decisão final sobre o início ou não da terapia e o momento mais conveniente para que ocorra (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Uma vez decidido o momento apropriado para início da terapia, o ponto seguinte consiste na escolha da medicação adequada, com base nos escassos estudos *in vitro* e ensaios clínicos que auxiliarão na tomada de decisão. Atualmente, o manejo clínico se concentra no controle das infecções com agentes que são ativos contra HIV-1 e HIV-2, quando possível (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Existem semelhanças maiores entre o HIV-1 e HIV-2, quando comparado a outros retrovírus humanos. Todavia, as diferenças presentes nos genes da transcriptase reversa e da protease (PR) resultam em uma susceptibilidade distinta aos diferentes agentes antirretrovirais, em particular aos inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTI) (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Dados sugerem que alguns inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTIs) podem não ser tão eficazes contra o HIV-2, devido aos polimorfismos na transcriptase reversa que levam a uma variação no potencial antiviral desses agentes. Alguns estudos indicam concentrações similares desses fármacos para inibir a replicação do HIV-1 e HIV-2, outros apontam uma ação menos intensa que exigira uma maior concentração de zidovudina para suprimir HIV-2 (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

O uso de análogos de nucleotídeos inibidores da transcriptase reversa (como tenofovir) tem sido eficaz na profilaxia pós-exposição, no prazo de 36h de exposição intravaginal, com HIV-2 em modelo primata não-humano (BOCK; MARKOVITZ, 2001). A análise genotípica de pacientes infectados com HIV-2 em uso de terapia antirretroviral mostrou que muitas das substituições de aminoácidos vistas em HIV-1, que estão associadas à resistência a NRTI, também são presentes em HIV-2. Algumas mutações de resistência (K65R, Q151M e M184V), em combinação, podem conferir resistência ao NRTI e causar falha na supressão viral (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Embora os inibidores de protease (IP) sejam ativos contra HIV-2, os polimorfismos naturais levam a uma redução na efetividade dessas drogas. Os IP têm uma constante de inibição 10 a 100 vezes menor no HIV-2 quando comparado com o HIV-1. O guia de tratamento Francês de 2008 indica o uso de atazanavir, fosamprenavir e tipranavir com certos cuidados em doentes HIV-2 reativos (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Saquinavir, lopinavir e darunavir demonstraram atividade semelhante entre o HIV-1 e o HIV-2; já o indinavir, nelfinavir e o ritonavir parecem ser menos ativos contra o HIV-2 do que contra HIV-1. O atazanavir tem uma atividade mais baixa e variável contra o HIV-2, em comparação com o HIV-1 (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

O HIV-2 é intrinsecamente resistente a inibidores de transcriptase reversa não nucleosídeos (NNRTI) de 1ª geração, já que essa classe de drogas bloqueiam a transcrição reversa do HIV-1 através de um sítio de ligação específico que não está presente no HIV-2. Inibidores de fusão (enfuvirtida) não têm efetividade (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Dentre os antirretrovirais mais recentes, HIV-2 parece ser sensível a inibidores de integrase, raltegravir e elvitegravir. Como o HIV-2 utiliza uma grande variedade de correceptores para invasão celular, a efetividade do antagonista de CCR5 maraviroque parece incerta (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

O guia de diretrizes de 2010 da Organização Mundial de Saúde propõe um esquema de três NRTIs para tratamento do HIV-2, possibilitando o uso alternativo de dois NRTIs com ritonavir potencializado com IP (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

O Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, em seu

guia de diretrizes, sugere o início do tratamento com IP potencializados, sem especificar quais drogas devem ser utilizadas. Apesar disso, com base nos ensaios observacionais, lopinavir ou darunavir potenciados com ritonavir são escolhas razoáveis para esquemas de inibidores de protease (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Tenofovir com emtricitabina ou lamivudina são recomendados como componentes do regime NRTIs e, alternativamente, também podem ser utilizados zidovudina com lamivudina (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Em relação ao tratamento de mulheres grávidas infectadas pelo HIV-2, o uso de zidovudina mais lamivudina com lopinavir/ritonavir é o regime atualmente recomendado pelo Departamento de Saúde de Nova Iorque, podendo o esquema tenofovir mais emtricitabina com lopinavir/ritonavir ser utilizado alternativamente. Para as mulheres infectadas pelo HIV-2 que não aderirem ao tratamento durante a gravidez, a profilaxia com zidovudina é indicada para prevenir a transmissão viral da mãe para criança, apesar de o risco de transmissão vertical do HIV-2 ser menor do que HIV-1 (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

O tratamento para infecções oportunistas em pacientes com HIV-2 é similar aos direcionados àqueles com HIV-1 e, apesar da escassez de dados para o tratamento de infecções oportunistas em pacientes com HIV-2, os resultados documentados apresentam maior eficiência no quadro da infecção pelo HIV-2. Os regimes profiláticos e o tempo de tratamento são menos agressivos no contexto de uma infecção por HIV-2, embora não haja concretos protocolos clínicos com terapias antirretrovirais a infecções oportunistas em pacientes com HIV-2 (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

O monitoramento da resposta ao tratamento e resistência a drogas tomam como base critérios imunológicos e virológicos. A resposta de células TCD4+, com recuperação quantitativa das subpopulações, parece ser menor na terapia com pacientes HIV-2 do que naqueles infectados com HIV-1 (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Já o monitoramento da resistência a drogas é mais complexo pela inexistência de ensaios comerciais para tal fim. Genotipagens realizadas em ensaios de pesquisa apontaram para o surgimento de mutações de resistência no gene integrase durante o tratamento com raltegravir e, assim como para os pacientes com HIV-1, torna-se mais frequente o surgimento da multirresistência em decorrência de

regimes inadequados e não adesão ao esquema de medicamentos. A demanda por um direcionamento terapêutico específico para HIV-2 é cada vez mais expressiva (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Estudos voltados para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados ao tratamento da infecção por HIV-2 enfrentam certos obstáculos: menores cargas virais intrínsecas à infecção pelo HIV-2; o grande quantitativo de infectados concentram-se na África Ocidental e em locais com acessos limitados a medicamentos; as metodologias de detecção não são amplamente difundidas e diversificadas; o uso de antirretrovirais incorretos para o tratamento inicial que intensificam a resistência viral. Mais estudos fazem-se necessários para aperfeiçoar as estratégias de tratamento de pacientes infectados com HIV-2 (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Embora a infecção pelo HIV-2 seja menos agressiva e a progressão para AIDS menos frequente, há esquemas terapêuticos diferenciados para HIV-2. Os indivíduos infectados com HIV-2 com uma doença progressiva têm, em geral, uma menor resposta ao tratamento (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012), fato que torna relevante a diferenciação entre HIV-1 e HIV-2 em pacientes com risco de infecção pelo HIV-2.

### **1.7 Epidemiologia do HIV-2 no Mundo**

A primeira descrição do HIV-2 foi realizada em regiões urbanas da África Ocidental, com evidências da presença do vírus desde 1966. Apesar das taxas menores de infecção fora do continente africano, ainda há uma considerável prevalência na África Ocidental e nos países com laços históricos e socioeconômicos com essa região. Simultaneamente, o HIV-2 é cada vez mais reconhecido em todo o mundo, representando uma preocupação para outros continentes (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Predominante na África Ocidental, a infecção por HIV-2 apresentava uma prevalência >1% da população regional no final de 1980. Estimou-se um quantitativo de um a dois milhões de pessoas com HIV-2 em países como Guiné-Bissau, Gâmbia, Senegal, Cabo Verde, Costa do Marfim, Mali, Serra Leoa e Nigéria. Essa prevalência reduziu nos últimos anos, principalmente, nos jovens, em paralelo com um aumento da infecção pelo HIV-1 (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

A disseminação inicial da infecção pelo HIV-2 foi observada pelos relatos de casos em países com vínculos com a África Ocidental (CARVALHO et al., 2012; SORIANO et al., 2000). Cazein et al. (1996) realizaram um estudo de prevalência da infecção pelo HIV-2 na Europa em 22 países, entre 1989 e 1995, a partir de bases de dados geridas pelo Centro Europeu de Monitoramento da AIDS, inclusos nas análises os dados de soroprevalência publicados e não publicados fornecidos pelos entes de vigilância de HIV/AIDS dos países participantes.

Os grupos de análises foram divididos: dados oriundos da vigilância de soroprevalência em mulheres grávidas, com ou sem interrupção da gravidez, sendo detectados três casos em Paris, oito em Londres e três em Amsterdã; dados de rastreio de doações de sangue, havendo sido notificados três casos na França, um da Estónia, um na Grécia e um no Reino Unido, uma prevalência inferior a 0,3 por 100.000; os resultados de consultas direcionadas para IST, encontrado um percentual de 0,1% de todos os HIV positivos no Reino Unido e 13% em Portugal; outras populações selecionadas, como grupo de hemofílicos na Espanha, onde foram encontrados 41 casos de infecção por HIV-2, um representativo de 3,5% de todos os reativos para HIV (CAZEIN et al., 1996).

Em geral, esse levantamento de casos indica que o HIV-2 era relativamente raro na Europa, no período de 1989 e 1995. Os números representam menos de 1% de todas as infecções por HIV, em contraste, com uma prevalência consideravelmente alta em Portugal no mesmo período (CARVALHO et al., 2012; SORIANO et al., 2000).

A entrada do vírus em Portugal, a partir de Guiné-Bissau, pode ter ocorrido durante o período da Guerra de Independência (1961-1974) e a disseminação para ex-colônias portuguesas (Angola, Moçambique e Brasil) e regiões da Índia (Goa e Maharashtra) que mantinham relações próximas com Portugal foram relatadas em diferentes estudos (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011). O HIV-2 foi responsável, em 2000, por 4,5% dos casos de AIDS em Portugal, apresentando a maior prevalência da Europa, percentual que reduziu para 2,6% em 2000 e 2,3% em 2008. Os seis principais subtipos de HIV-2 (A–F) já foram descritos no país, sendo o subtipo A a variante mais predominante entre nativos e imigrantes (SORIANO et al., 2000; CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011; CARVALHO et al., 2012).

Soriano et al. (2000) apontaram que mais de 60% dos novos casos diagnosticados de HIV-2 em Portugal não apresentavam uma rastreabilidade direta com o oeste africano, corroborando dessa forma a presença de uma difusão local.

Carvalho et al. (2012) avaliaram 442 pacientes de diferentes regiões do país que representavam 37% de todas as infecções por HIV-2 notificadas no período de 1984 a 2007 em Portugal, albergando uma vasta área geográfica, definida pelos autores como uma amostra representativa da dinâmica de transmissão do HIV-2 no país.

Os resultados apontaram que, até 2000, a maioria dos HIV-2 reativos eram homens nascidos em Portugal e residentes na região norte do país. Tal fato corrobora o papel-chave da guerra de independência na introdução do vírus em Portugal via soldados enviados para África que adquiriram a infecção por transmissão sexual, transfusões sanguíneas e procedimentos cirúrgicos inseguros (SORIANO et al., 2000; CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011; CARVALHO et al., 2012).

No período entre 2000 e 2007, esse perfil sofreu modificações com os deslocamentos populacionais, os pacientes diagnosticados com HIV-2 passaram a representar os imigrantes da África Ocidental, predominantemente mulheres e residentes de Lisboa. Os imigrantes de Guiné-Bissau e de Cabo Verde representavam, em 2008, respectivamente, 6% e 12% da população total de imigrantes em Portugal, quantitativo que aumentou nos anos seguintes (SORIANO et al., 2000; CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011; CARVALHO et al., 2012).

Portugal serviu como um centro de difusão do vírus para outros locais da Europa pelo elevado número de casos, de um modo geral. Sem embargo, na Europa e na América do Norte, a maioria dos indivíduos infectados por HIV-2 identificados eram imigrantes africanos, nativos que viajaram para África Ocidental ou tiveram relações sexuais com pessoas de países endêmicos (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011; SORIANO et al., 2000).

Na França, 75 casos de infecção por HIV-2 foram identificados em 1994, 58 em pacientes emigrantes da África Ocidental (BOCK; MARKOVITZ, 2001). Entre 2003 e 2006, houve 10.184 novos diagnósticos de HIV na França, 1,8% desses indivíduos eram HIV-2 reativos, com uma divisão de 1,6% monoinfectados por HIV-2 e 0,2% em coinfeção HIV1/2 (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Em 1988, os primeiros casos de infecção pelo de HIV-2 na Espanha foram identificados em três imigrantes africanos residentes em Barcelona. Do momento das notificações iniciais até 1998 haviam sido identificados 92 pacientes reativos, a maioria originários da África Ocidental, sendo predominantes os subtipos A e B (MACHUCA et al., 1999).

De 1988 a 2006, um perfil de baixa prevalência foi mantido, com um

quantitativo de casos de infecção pelo HIV-2 que ultrapassava 146 casos notificados, 101 (69%) desses eram homens e 16 (11%) foram diagnosticados com coinfeção HIV-1 e HIV-2. Outrossim, como em análises epidemiológicas de outros países, 110 (75,3%) eram imigrantes africanos e, dos espanhóis infectados com HIV-2, houve relatos de viagens e convivência em áreas endêmicas ou mantiveram relações sexuais com pessoas dessas regiões. No ano de 2006, apesar de não ter sido observado aumento na incidência da doença, dos oito novos casos detectados, todos eram indivíduos imigrantes da África subsaariana (TORO et al., 2007).

Até 2006, pelo menos 65 doentes com HIV-2 foram detectados em Luxemburgo, província da Bélgica, 63% dos pacientes oriundos de países da África Ocidental (RUELLE et al., 2008). Além disso, entre 1985 e 2003, 52 pessoas foram diagnósticas com HIV-2 ou coinfectadas com HIV-1 e HIV-2, com infecções adquiridas na África Ocidental e diagnosticadas na Inglaterra, no País de Gales e na Irlanda do Norte (DOUGAN et al., 2005).

Dos casos de HIV-2 relatados na Ásia, 95% foram identificados na Índia. A primeira evidência da infecção por HIV-2 na Índia foi em 1991, enquanto a primeira detecção de HIV-1 ocorreu em 1986. Houve uma disseminação rápida do HIV, uma vez que é um dos países mais populosos do mundo e, atualmente, há uma taxa considerável de indivíduos vivendo com HIV/AIDS no país (KASHYAP; GAUTAM; BHALLA, 2011). Há relatos da infecção pelo HIV-2 e coinfeções HIV-1 e HIV-2 em diferentes regiões indianas, sendo as taxas de prevalência variáveis de acordo com o local.

Kashyap et al. (2011) realizaram uma análise retrospectiva da soroprevalência da infecção em Deli (norte da Índia) e regiões adjacentes, no período de 2004 a 2009, em amostras de indivíduos que procuraram o centro de testagem e aconselhamento do *Hospital Lok Nayak*. A triagem dos casos foi realizada por teste rápido e a confirmação por WB, detectando 1.938 casos (8,8%) de infecção pelo HIV-1, seis casos (0,03%) de HIV-2 reativos e um caso (0,005%) de coinfeção HIV-1 e HIV-2.

Dentre os casos de HIV-2 detectados, todos eram homens com idades entre 18 a 60 anos, com histórico de viagens para locais endêmicos relatado em metade dos casos, e 86% das exposições foram associadas a contato sexual com profissionais do sexo. Ensaio baseado em detecção molecular do HIV-2 não foram empregados nesse estudo (KASHYAP; GAUTAM; BHALLA, 2011).

Os dados da região Sul Indiana para o mesmo período mostraram uma prevalência de 2,1% de coinfeção e uma variação de 0,13% a 1,8% de monoinfeção por HIV-2. Já os relatos de soroprevalência no Oeste da Índia, em grupos de alto risco, encontraram taxas de 5% a 20% para coinfeções HIV-1 e HIV-2. Um estudo soropidemiológico com coorte de Maharashtra aponta taxas de 1,7% para HIV-2 e 4,7% para dupla infecção HIV-1 e HIV-2 (KASHYAP; GAUTAM; BHALLA, 2011).

Em 2003, foi descrito o primeiro caso de HIV-2 nas Filipinas em uma mulher de 43 anos que relatou contato sexual com um indiano (1998) e um americano (1999). A confirmação da infecção foi possível através do *Western Blot* específico para HIV-2 (New Lav Blot II da Bio-Rad), apresentando as bandas p16, p26, p34, p56 de *gag*, p68 de *pol*, gp36, gp105 e gp140 de *env*; amplificação do material genético do HIV-2 na amostra; resultado positivo para DNA proviral extraído de PBMC e amplificado a partir de *primers* para região LTR do HIV-2 (LEAN et al., 2003).

No caso, o sequenciamento para caracterização viral local indicou proximidade com as estirpes indianas. Tais dados indicam a introdução do vírus no país e a importância de modificações na testagem de diagnóstico para HIV, proporcionando uma distinção viral tipo-específica (LEAN et al., 2003).

Dez casos de HIV-2, a maioria do subtipo A, foram isolados na Coreia do Sul. A primeira detecção no país ocorreu no início de 1990 em um marinheiro coreano infectado no exterior e, desde 2002, casos de transmissões internas foram detectados. Investigações moleculares identificaram que em seis casos a transmissão poderia ter ocorrido a partir de uma única fonte pelas similaridades genéticas. A transmissão nacional é rara e restrita a regiões específicas, embora esses estudos indiquem a introdução do vírus no país (NAM et al., 2006).

Já nos Estados Unidos, o primeiro caso de infecção por HIV-2 foi identificado em uma mulher africana (oriunda da África Ocidental) com toxoplasmose no sistema nervoso central, em 1987 (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011). Em 1981, o Centro de Controle de Doenças (CDC) iniciou o rastreamento da AIDS nos EUA, mas somente em 1992 foi implantada a testagem de HIV-2 em doações de sangue, sendo realizada também análises retrospectivas em amostras doadas de 1987 a 1989.

Entre junho de 1992 a junho de 1995, foram reportados 62 casos nos EUA, três desses encontrados entre doadores de sangue. A maioria destes indivíduos portadores de HIV-2 nos EUA possuíam vínculos nítidos com o continente africano, por nascimento ou parceiros sexuais (BOCK; MARKOVITZ, 2001).

Durante o período de junho de 1988 a junho de 2010, um total de 242 casos de HIV-2 foram reportados, principalmente entre pessoas oriundas da África Ocidental, sendo 46% na cidade de Nova Iorque. Entretanto, os imunoenaios utilizados durante esse período não apresentavam uma discriminação tipo-específica, sem reatividade cruzada, para o HIV-2. Com isso, não seriam confiáveis para a emissão de um resultado confirmatório de infecção por esse tipo de vírus (TORIAN et al., 2011).

Durante a investigação de um surto ou no estabelecimento de um sistema de vigilância epidemiológica é necessária a garantia de uniformidade e segurança dos dados obtidos. Para tal fim, a definição de caso proporciona essa padronização. Segundo Waldman et al. (1998, p.19), a definição de caso “pode ser entendida como um conjunto de critérios que se utilizam para decidir se uma pessoa tem ou não uma particular doença ou apresenta um determinado evento adverso à saúde”.

A partir de 2010, CDC definiu que para confirmação da infecção pelo HIV-2 pelo menos um dos seguintes critérios deveria ser atendido: 1) uso de imunoenaios tipo-específicos HIV1/HIV-2 com resultado reativo para HIV-2; 2) teste de amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) positivo para HIV-2, apesar de não haver um ensaio aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA/EUA); 3) resultado de *immunoblot* positivo para HIV-2 e negativo ou indeterminado para HIV-1. Com isso, dos 242 casos inicialmente notificados entre 1988-2010, 47 foram excluídos por não ter informações suficientes para discriminar possíveis duplicidades de notificação e 29 casos não se encaixaram nos critérios definidos (TORIAN et al., 2011).

A amplificação de ácidos nucleicos evidenciou 19 casos (11%) de coinfeção HIV-1 e HIV-2. Possivelmente, o número real de casos de HIV-2 seja maior que essas estimativas, devido à integração global, o crescente deslocamento humano, à subnotificação e, principalmente, pela ausência de testagem específica para HIV-2 (PCR ou imunoenaios tipo-específicos) em ensaios de triagem de diagnóstico de HIV, em que prováveis infecções pelo HIV-2 não foram reconhecidas, cujos resultados eram negativos ou persistentemente indeterminados (TORIAN et al., 2011).

Os 166 casos identificados foram caracterizados em relação à região de notificação, ao país de nascimento dessas pessoas, a raça/etnia, o sexo, a idade e o fator de risco associado à transmissão. Referentes ao local de nascimento dos diagnosticados com HIV-2 no período de 1987-2009, 164 pacientes tiveram suas origens identificadas: 132 (81%) eram da África Ocidental, sete casos (4%) de outras regiões africanas, seis (4%) não especificaram de qual região africana eram

originários, nove (6%) pacientes indianos, cinco estadunidenses, três europeus e dois mexicanos (TORIAN et al., 2011).

Em relação aos locais de notificação, 77 casos (46%) foram reportados na cidade de Nova Iorque, 24 (15%) no Sul, 18 (11%) no Meio Oeste, 14 (8%) no Oeste. Houve uma maioria de pacientes negros não hispânicos (89 % dos casos). Um percentual de 58% de homens, com uma idade média de 39 anos (variação 21-76 anos) (TORIAN et al., 2011).

Das 50 mulheres com idades entre 15-44 anos diagnosticadas, 24 (48%) estavam grávidas antes ou após o diagnóstico de HIV-2. Os filhos dessas mulheres não foram identificados como portadores do HIV-2, porém informações completas de acompanhamento de seis dessas crianças não foram obtidas (TORIAN et al., 2011).

Os fatores de transmissão foram identificados em alguns casos. Por 38 pacientes (23%) foram reportados contatos heretosssexuais com parceiros infectados com HIV, quatro casos em homens que faziam sexo com homens e quatro casos de uso de drogas injetáveis (TORIAN et al., 2011).

De acordo com o censo demográfico de 2000, estimou-se que dos 31,1 milhões de imigrantes nos EUA, um quarto de milhão eram de países da África Ocidental com alta prevalência de HIV-2. Imigrantes africanos estão por todo país, entretanto, é possível estabelecer algumas “áreas de concentração” para determinados grupos (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Há estimativas de 200.000 indivíduos de Cabo Verde nos EUA, a maioria concentrada em Massachusetts e Rhode Island; Washington agrupa imigrantes da Nigéria e Serra Leoa; em Chicago residem um grande número de ganenses (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011). Entretanto, de acordo com Torian et al. (2011), Nova Iorque é a principal porta de entrada de imigrante africanos nos Estados Unidos e dados da cidade mostram que, do período entre junho de 2000 a dezembro de 2008, o intervalo médio entre o diagnóstico inicial da infecção por HIV e a identificação do agente etiológico como HIV-2 foi 487,5 dias (TORIAN et al., 2010).

Pela dinâmica epidemiológica do HIV-2, fica evidente que em um mundo cada vez mais globalizado, os aspectos sociais, econômicos, culturais e epidemiológicos enfatizam a necessidade de desenvolver abordagens especiais para as populações migrantes e promoção de cuidados de saúde sensíveis a eles. Exige-se novas abordagens no que se refere ao planejamento dos serviços de saúde e metodologias de diagnóstico (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

### 1.7.1 Epidemiologia do HIV-2 no Brasil

As primeiras descrições de HIV-2 no Brasil foram publicadas em 1987, um ano após a descrição do HIV-2 na África. Foram identificados quatro indivíduos reativos para HIV-2 nas testagens sorológicas com ensaio imunoenzimático (ELISA) e *Western Blot* (WB), sendo descritos como travestis residentes em São Paulo, com uma média de 28 parceiros sexuais por semana e um deles relatou uma viagem para Paris em anos anteriores, não sendo possível estabelecer uma ligação epidemiológica direta com o continente africano. (VERONESI et al., 1987).

Nos anos seguintes e até 1996, foram publicados outros cinco trabalhos ora confirmando, ora negando a existência do HIV-2 no Brasil (CORTES et al., 1989; HENDRY et al., 1991; GRANATO et al., 1992; CARVALHO et al., 1996; BROUTET et al., 1996). A maioria desses estudos de detecção do HIV-2 desenvolvidos no Brasil foram baseados na investigação da presença de anticorpos com metodologias cujas especificidades não permitiam a diferenciação entre as infecções pelo HIV-1 e HIV-2 e alguns estudos apresentaram resultados inconclusivos enquanto a maioria falhou na identificação de anticorpos HIV-2.

Pieniazek et al. (1991) publicaram trabalho com análises sorológicas de amostras de 495 pacientes hospitalizados do Rio de Janeiro que indicaram uma prevalência de 0,4% de infecção por HIV-2 e 4% de coinfeção HIV-1/HIV-2. Entretanto, a testagem confirmatória com ensaio imunoenzimático tipo-específico confirmou a coinfeção em 0,4% dos pacientes (2 casos).

O material genético viral de PBMC foi extraído e amplificado com sondas específicas para o HIV-2, confirmando a coinfeção em dois indivíduos homossexuais, respectivamente, de 31 e 25 anos, residentes no Rio de Janeiro. Os pesquisadores não conseguiram localizar esses indivíduos para obter informações a respeito da transmissão viral, se a aquisição do vírus foi por meio de viagens a países estrangeiros endêmicos ou por contato com pessoas oriundos destes locais (PIENIAZEK et al., 1991).

Tais resultados evidenciam a circulação do HIV-2 no Brasil. Em 1998, Vicente et al. (1998) estudaram 200 amostras originadas de todo o Brasil, utilizando a PCR como ferramenta diagnóstica e não conseguiram confirmar a circulação do HIV-2 no Brasil a partir dessa amostragem.

Fusuma et al. (2005) comprovaram, por teste molecular, a transmissão de

HIV-2 do subtipo A para uma brasileira de 45 anos, residente de São Paulo, cujo parceiro era de Guiné-Bissau. Esse foi primeiro caso reportado e confirmado de transmissão de HIV-2 dentro do país.

O sequenciamento do HIV-2 isolado mostrou um sítio extra do promotor NF-kB que poderia ser associado a um aumento na citopatogenicidade viral. Uma vez que HIV-2 normalmente apresenta somente um sítio NF-kB, uma característica que o difere do HIV-1 e está relacionado a menor expressão viral, a presença dessa inserção atenta à necessidade de um monitoramento mais acurado da disseminação do HIV-2, mesmo com menores taxas de transmissão e patogenicidade comparadas ao HIV-1 (FUSUMA et al., 2005).

Com isso, devido ao crescimento da população mundial, é plausível que a migração e a mobilidade populacional aumentem proporcionalmente e, apesar de a incidência de HIV-2 declinar na África Ocidental, o aumento desse fluxo migratório promove a manutenção e disseminação do vírus para outros países. Destaca-se com isso a necessidade de discutir o impacto da migração na epidemiologia das doenças infecciosas nacionais e a importância de programas de prevenção e diagnóstico de HIV 1/2 mais efetivos, com o uso de fluxos e metodologias de diagnóstico eficientes.

### **1.8 Testagem e Diagnóstico viral**

A portaria n. 29 de 17 de dezembro de 2013 regulamenta o diagnóstico da infecção pelo HIV no Brasil, normatizando fluxos seguros de testagem, para os setores públicos e privados da sociedade, com base nos conhecimentos técnicos e científicos da infecção e das metodologias de diagnóstico disponíveis (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Uma vez que o Brasil é um país com extensa demografia e diversidades regionais, ao mesmo tempo em que apresenta uma considerável desigualdade social, o Manual Técnico para Diagnóstico da Infecção pelo HIV aprovado pela portaria supracitada estabelece seis fluxogramas, quatro tendo como base o contexto laboratorial e dois com aplicação de testes rápidos, que viabilizam um diagnóstico seguro da infecção em diferentes contextos (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

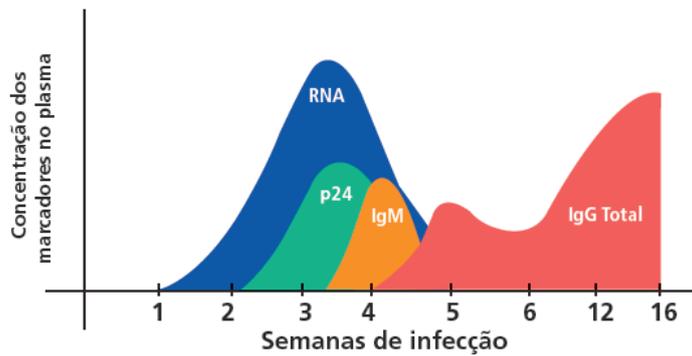


FIGURA 4 – MARCADORES SANGUÍNEOS DA INFECÇÃO PELO HIV

FONTE: Ferreira-Junior et al., 2014

Diferentes marcadores (Figura 4) podem ser detectados durante a evolução da infecção pelo HIV. De forma progressiva, há um pico inicial de viremia (altos níveis de RNA viral plasmático) até a terceira e quarta semanas após a exposição e, de modo subsequente, há um pico de detecção do antígeno viral p24 (proteína do capsídeo viral). Os níveis de p24 caem de acordo com o crescimento dos níveis de anticorpos anti-p24 e, posteriormente, haverá o aumento dos títulos de anticorpos anti-glicoproteínas do envelope viral. É possível detectar o DNA proviral a partir de PBMC ao longo de todo o período de infecção (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Nos últimos anos, as metodologias laboratoriais evoluíram, sendo voltadas para diferentes marcadores da infecção pelo HIV – anticorpos anti-HIV e antígenos virais, proteína p24, RNA ou DNA proviral. Uma vez que não existe uma metodologia com 100% de sensibilidade e especificidade, o uso de dois testes distintos em cada fluxo aumenta a probabilidade de detecção de casos verdadeiramente positivos (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

São dois testes, sendo um de triagem (mais sensível) e outro confirmatório (mais específico), que levarão a um resultado “reagente” com base na confirmação pelo segundo teste. O resultado “não reagente” poderá ser dado a partir do teste de triagem, salvo nos casos de suspeita de soroconversão recente nos quais uma testagem posterior é recomendada. Para as amostras reagentes, recomenda-se uma etapa complementar para confirmação do diagnóstico com testes mais específicos que os de triagem (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Uma situação de infecção recente, onde não há anticorpos em circulação, mas apenas antígenos detectáveis, o teste confirmatório a ser escolhido é a quantificação da CV, com base na anamnese do paciente, a fim de ratificar a infecção e excluir resultados falso-positivos (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Os laboratórios de testagem contam com uma liberdade de escolha do fluxograma mais adequado a sua realidade laboral. Os ensaios de triagem recomendados pelo Ministério da Saúde são ensaio imunoenzimático (ELISA); ensaio imunoenzimático de micropartículas (MEIA); ensaio imunológico quimioluminescente (QL); ensaio imunológico com revelação eletroquimioluminescente (EQL); ensaio imunológico fluorescente ligado à enzima (ELFA); ensaio imunológico quimioluminescente magnético (CMIA); testes rápidos de imunocromatografia, aglutinação de partículas de látex ou imunocoração. Já os métodos de *imunoblot* (IB), *imunoblot* rápido (IR), *Western Blot* (WB) e quantificação do RNA viral de HIV-1 (CV, opção preferencial) são recomendados para segunda etapa confirmatória do diagnóstico (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Estudos de Fiebig et al. apontam o período de reatividade de cada metodologia de testagem após o evento de infecção, servindo como base para construção dos fluxogramas. O sistema proposto estabelece seis estágios na infecção recente pelo HIV, de acordo com o padrão de reatividade a marcadores específicos (RNA viral, antígeno, p24, ELISA e *Western Blot*), que surgirão nos ensaios de detecção ao longo da progressão da infecção viral (Figura 5). Tal sistema é a base para a tomada de decisão sobre quais metodologias são mais adequadas em contextos distintos da infecção pela sintomatologia e histórico do paciente (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

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

FIGURA 5 – REATIVIDADE DE CADA METODOLOGIA DE ACORDO COM A PROGRESSÃO DA INFECÇÃO

FONTE: Universidade Federal De Santa Catarina, 2014

LEGENDA: O quadro apresenta a reatividade de cada metodologia de acordo com a progressão do início da infecção e uma média da estimativa da duração de cada estágio. A janela imunológica consiste no período no qual os testes utilizados na rotina de diagnóstico não são capazes de detectar o vírus (estágio 0). No estágio IV, *Western Blot* apresenta padrão indeterminado, com presença de bandas específicas de HIV, porém não preenche os critérios de resultado reativo que são a presença de pelo menos 2 das 3 bandas de p24, gp41 ou gp120/160. Nos estágios seguintes, o *Western Blot* é reagente.

Os testes de 4ª geração e os testes rápidos, apesar de não estarem incluídos na classificação de Fiebig, detectam a infecção a partir dos estágios II, III ou IV, de acordo com o fabricante. Testes rápidos que utilizam fluido oral não possuem, pela ausência de painéis de indivíduos em soroconversão, um estágio de classificação de Fiebig definido (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Algumas ressalvas são feitas em relação à aplicação desse sistema de classificação. Uma delas reside na variabilidade de sensibilidade dos ensaios de acordo com o fabricante, que reflete diretamente na atribuição do teste a determinado estágio. Além disso, a aplicação da classificação na prática clínica tem grande limitação resultante da variabilidade de acesso aos serviços de saúde, já que os pacientes, habitualmente, procuram o auxílio médico após a soroconversão, que também apresenta uma diversidade temporal individual (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Outra limitação do modelo é sua elaboração a partir de dados de doadores, pessoas assintomáticas ou com sintomas brandos, que, em comparação com indivíduos com quadros clínicos proeminentes, podem apresentar distinções no ritmo de progressão da doença. Outrossim, os ensaios sorológicos empregados na padronização utilizam proteínas do subtipo-B do HIV-1, criando viés para indivíduos infectados com outro subtipo (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Com isso, o sistema de estagiamento laboratorial e os fluxogramas de diagnósticos associados fornecem um quadro de referência para acompanhamento e diagnóstico eficaz da infecção pelo HIV.

#### *1.8.1 Teste rápido Imunoblot Bio-Manguinhos e Teste rápido Geenius*

O Teste Rápido (TR) de plataforma de duplo percurso (DPP) *Imunoblot* HIV 1/2 do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, é um ensaio qualitativo confirmatório para detecção de anticorpos anti-HIV-1/2 em amostras de sangue total, soro ou plasma humano (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

É um ensaio baseado na metodologia de imunocromatografia que utiliza uma membrana de nitrocelulose como fase sólida de difusão em que estão ligadas às

proteínas recombinantes dos vírus HIV-1, inclusive as do grupo O, e HIV-2 distribuídas em linhas diferentes de visualização. Anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal funcionam como revelador do resultado do teste (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

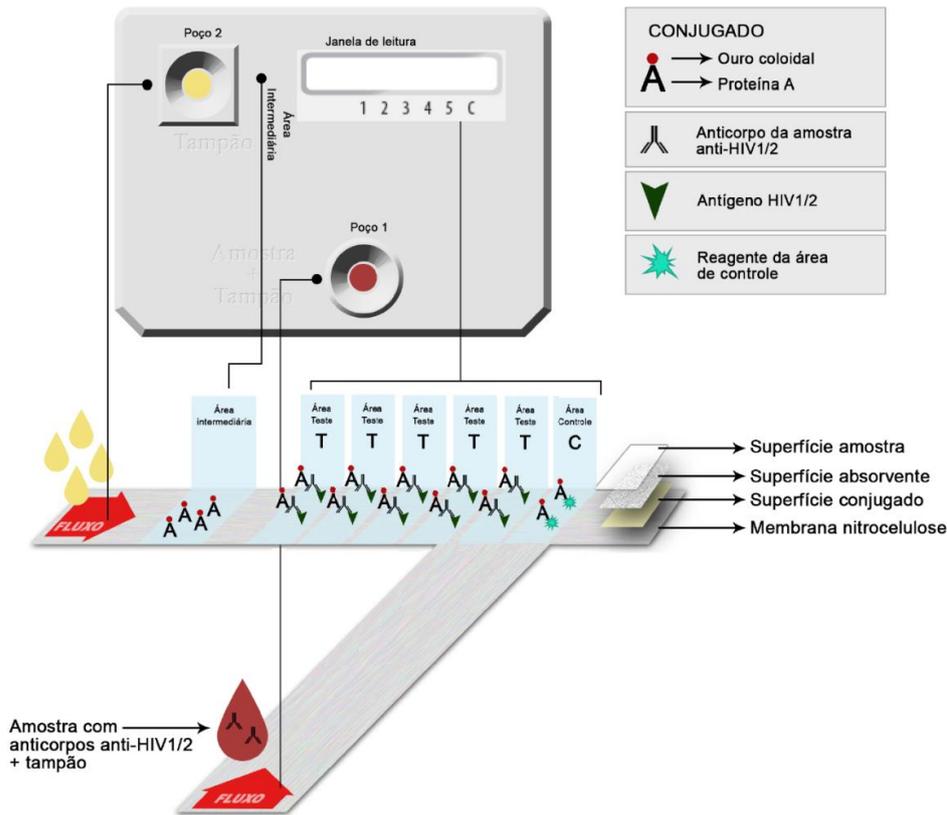


FIGURA 6 – DISPOSITIVO DO TR DPP *IMUNOBLOT* HIV 1/2

FONTE: Modificado a partir de Universidade Federal De Santa Catarina, 2014

Há três regiões básicas no dispositivo de teste *Imunoblot* rápido (Figura 6): poço 2, janela de leitura e poço 1. No poço 1, aplica-se a amostra e o tampão e, após o intervalo indicado na bula do ensaio, acrescenta-se o tampão no poço 2 para migração do conjugado (encontrado na área intermediária). Na janela de leitura estão os antígenos de HIV-1 e HIV-2 fixados, representando a linha 1 de teste a proteína gp36 do HIV-2; a linha 2 a proteína gp160 do HIV-1; linha 3 a gp120 do HIV-1; linha 4 a gp41 do HIV-1; linha 5 a p24 de HIV-1 e a linha C é o controle processual do teste, demonstrando o funcionamento adequado dos reagentes e a validação do ensaio (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Algumas limitações no emprego do teste rápido para o diagnóstico da infecção pelo HIV consistem nos resultados falso-negativos, em situações, por

exemplo, de pacientes sabidamente soropositivos em tratamento antirretroviral e resultados não reagentes em indivíduos recém-infectados, dado que a produção de anticorpos leva algumas semanas após a infecção pelo vírus (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Na situação anteriormente mencionada, o teste deve ser repetido após 30 dias. A realização do teste anti-HIV não é indicada para crianças com idade inferior a 18 meses, visto que pode ocorrer a detecção de anticorpos maternos transferido por via placentária (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

O ensaio confirmatório TR Geenius HIV 1/2 da Bio-rad é um teste imunocromatográfico com maior especificidade empregado para confirmação e diferenciação de infecções pelo HIV-1 e HIV-2 em amostras de sangue total, plasma e soro com resultados reativos em procedimentos de diagnóstico de HIV. Possui moldes semelhantes ao emprego do TR DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos nos fluxogramas de diagnóstico do Manual do Ministério da Saúde (BIO-RAD, 2016b).

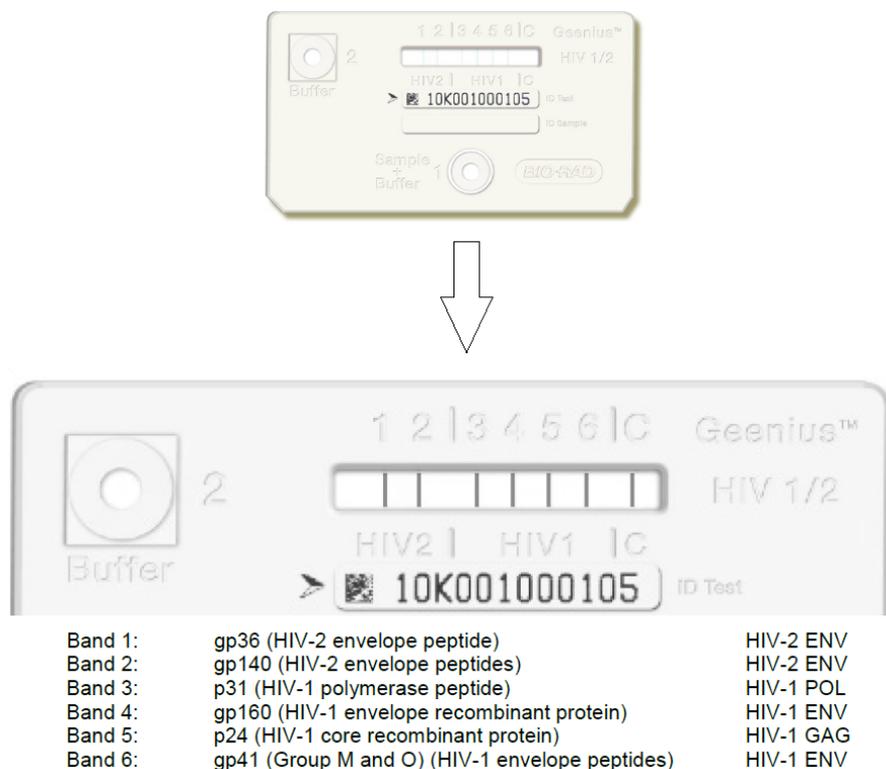


FIGURA 7 – DISPOSITIVO TR DPP GEENIUS HIV 1/2

FONTE: Modificado a partir de Bio-Rad, 2016b

O dispositivo TR Geenius HIV 1/2 (Figura 7) apresenta uma banda controle (C)

e seis linhas de teste correspondendo, respectivamente, à gp36 de HIV-2 (ENV); gp140 de HIV-2 (ENV); p31 de HIV-1 (POL); gp 160 de HIV-1 (ENV); p24 de HIV-1 (GAG); gp41 de HIV-1 (ENV). Logo, em comparação com o TR DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos, há uma banda extra para diferenciação da infecção pelo HIV-2 (BIO-RAD, 2016b).

### 1.8.2 Western Blot

Nessa técnica, os antígenos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com os pesos moleculares, e transferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose é a fase sólida, onde estão dispostas as proteínas e glicoproteínas virais fixadas e distribuídas conforme o peso molecular (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

A reação entre os antígenos fixados e os anticorpos da amostra é revelada por processo enzimático, por meio do conjugado de anticorpos de cabra anti-imunoglobulina humana marcados com fosfatase alcalina. A etapa final da técnica envolve a adição do substrato BCIP/NBT (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato e NitroBlue Tetrazolium) e sua degradação que gera um produto corado, visualizando a reação sobre a fita (*New Lav Blot I*, Bio-Rad).

### 1.8.3 Ensaio imunoenzimático

Os primeiros ensaios para diagnóstico da infecção pelo HIV surgiram em 1985, com o emprego de antígenos virais obtidos a partir da lise de culturas de células infectadas, viabilizando a detecção de anticorpos em amostras através da metodologia de ELISA ou ensaios imunoenzimáticos indiretos. Em 1986, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV passou a ser feito no Brasil (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

A segunda geração de ensaios, ainda no formato indireto, mas com emprego de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos surgem em 1987. As delimitações de regiões específicas das proteínas virais representaram um aumento na sensibilidade e especificidade dos (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Com os novos estudos, mostrando a variabilidade do HIV, antígenos dos

diferentes grupos de HIV-1 (M, N e O) e de HIV-2 foram incluídos nas metodologias de diagnóstico. Os ensaios de ELISA de 3ª geração, denominado ELISA sanduiche, surgiram para tornar a metodologia mais sensível e específica ao detectar as diferentes classes de anticorpos anti-HIV (IgG, IgM e IgA) e, conseqüentemente, representaram uma redução na janela imunológica (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

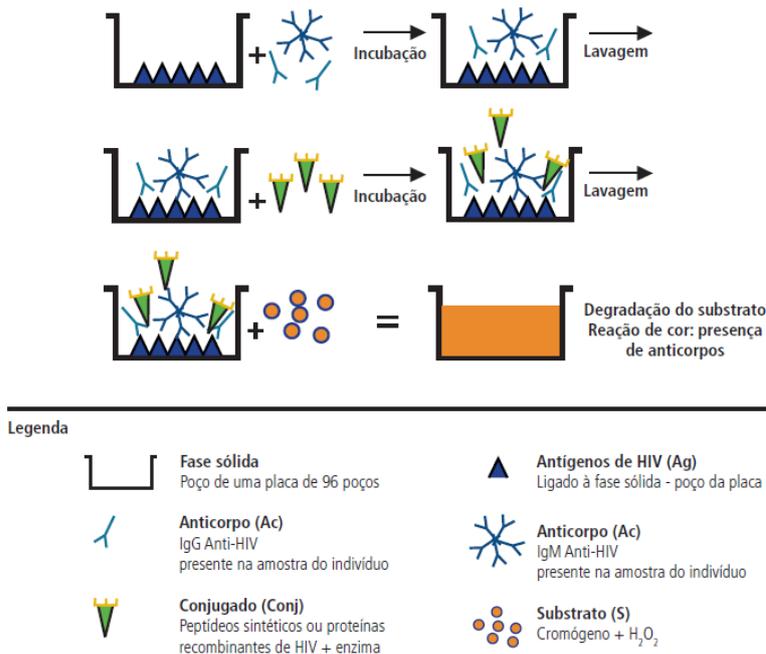


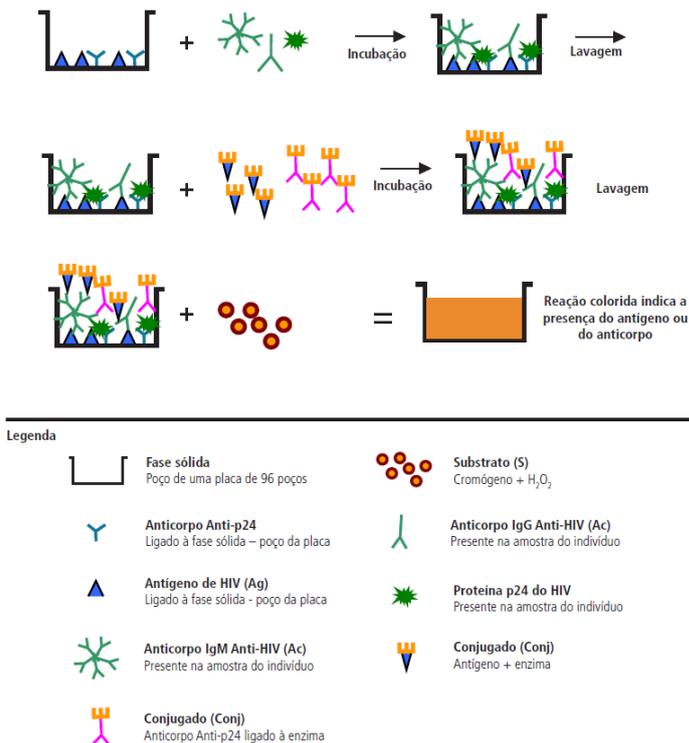
FIGURA 8 – ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE 3ª GERAÇÃO DO TIPO ELISA

FONTE: Ferreira-Junior et al., 2014

Como ilustrado na Figura 8, os antígenos são fixados na fase sólida e vão se ligar aos anticorpos presentes na amostra em análise. Em seguida, uma solução com proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos do HIV-1/2 conjugados com uma enzima é adicionada e, após incubação e lavagem, acrescenta-se o substrato (cromógeno e peróxido de hidrogênio) que levará à produção de cor de acordo com a presença de anticorpos da amostra. A leitura colorimétrica é feita no espectrofotômetro e os resultados são determinados pela densidade ótica (DO). O ponto de corte (*cut off*) é calculado com base no ensaio e possibilita a interpretação das reações como reagentes, não reagentes ou indeterminadas (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

A evolução tecnocientífica viabilizou os ensaios de 4ª geração, com capacidade de detecção simultaneamente antígenos p24 e anticorpos específicos

anti-HIV-1 e anti-HIV-2. A presença dos anticorpos na amostra é revelada pela adição de proteínas recombinantes conjugadas com enzima e os antígenos p24 detectados através de uma imunoglobulina anti-p24 conjugada a uma enzima na fase sólida que captura o antígeno p24 presente no soro. A janela diagnóstica dos ensaios de quarta geração é de aproximadamente 15 dias, de acordo com o fabricante do ensaio (Figura 9) (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).



#### Legenda

	Fase sólida Poço de uma placa de 96 poços		Substrato (S) Cromógeno + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Anticorpo Anti-p24 Ligado à fase sólida – poço da placa		Anticorpo IgG Anti-HIV (Ac) Presente na amostra do indivíduo
	Antígeno de HIV (Ag) Ligado à fase sólida - poço da placa		Proteína p24 do HIV Presente na amostra do indivíduo
	Anticorpo IgM Anti-HIV (Ac) Presente na amostra do indivíduo		Conjugado (Conj) Antígeno + enzima
	Conjugado (Conj) Anticorpo Anti-p24 ligado à enzima		

FIGURA 9 – ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE 4ª GERAÇÃO DO TIPO ELISA

FONTE: Ferreira-Junior et al., 2014

Ressalte-se que há uma variabilidade nos métodos de ELISA com relação ao grau de automação, daquelas realizadas por procedimentos manuais até as automatizadas (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

#### 1.8.4 Diagnóstico da infecção pelo HIV-2

O diagnóstico laboratorial do HIV-2 é dificultado pelo alto índice de reatividade cruzada entre o HIV-1 e o HIV-2. De uma maneira geral, o diagnóstico da infecção pelo HIV é realizado pela combinação de um teste imunoenzimático contendo antígenos do HIV-1 e do HIV-2, seguido pela confirmação com *Western blot* ou pelo uso de testes rápidos confirmatórios (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

No entanto, o uso de testes rápidos, ensaios imunoenzimáticos,

imunoensaios quimioluminescentes e *Western blot* com proteínas derivadas do HIV-1 e/ou do HIV-2 não possuem especificidade para o diagnóstico tipo-específico em razão de uma alta reatividade cruzada de anticorpos contra as proteínas de *gag*, *pol* e *env*. Essas proteínas podem levar erroneamente ao diagnóstico de HIV-1 em um indivíduo infectado pelo HIV-2 (TORIAN et al., 2010).

O único teste sorológico aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) que faz a detecção e diferenciação do HIV-2 é o teste rápido HIV 1/2 Multispot da empresa *BioRad Laboratories*. Ele utiliza uma metodologia de imunocaptação e incorporação de sequências peptídicas de proteínas de envelope do HIV-1 e HIV-2 que possibilita um diagnóstico diferencial para os dois tipos virais (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Por recomendação do Departamento de Saúde de Nova York, as amostras submetidas à testagem de HIV-1/2 com resultados reativos devem ser rastreadas por imunoensaios de diferenciação tipo-específicos subsequentes, nos casos recomendados de testagem para HIV-2, para diferenciação dos dois tipos de HIV. A detecção de RNA de HIV-2 pode ser realizada de forma adicional à sorologia (NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, 2012).

Os testes sorológicos e moleculares de diferenciação de HIV-1/2 devem ser especialmente adotados mediante observação durante a anamnese de certas situações de risco à infecção por HIV-2. O CDC recomenda a testagem para HIV-2 nas seguintes situações (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011):

- 1) pessoas em vulnerabilidade com base no histórico de exposição do indivíduo, incluindo pessoas que fizeram sexo com indivíduos infectados com HIV-2 ou de locais onde o HIV-2 é endêmico (regiões da África Ocidental, tais como, Guiné-Bissau, Cabo Verde, Gambia, Costa do Marfim, Mali, Mauritânia, Nigéria, Serra Leoa, Benin, Burkina Faso, Gana, Guiné, Libéria, Níger, São Tomé e Príncipe, Senegal, Togo e outros países como Angola, Moçambique e Índia);
- 2) pessoas que receberam cuidados médicos, injeções, imunizações, flebotomia, cirurgia ou participaram de ensaios em países onde HIV-2 é endêmico e/ou compartilharam agulhas com indivíduos infectados com HIV-2 ou de países endêmicos para a infecção;
- 3) indivíduos que nasceram de mães que apresentam fatores de risco para infecção HIV-2 ou são sabidamente infectadas com HIV-2;

- 4) pessoas com um quadro clínico sugestivo para infecção por HIV, infecções oportunistas ou sintomatologia típicas associadas ao HIV, mas a testagem para HIV-1 com resultado negativo ou indeterminado;
- 5) pessoas com padrões de bandas no *Western Blot* atípicos do HIV-1.

Para emissão de um resultado sorológico HIV-2 reativo, o CDC recomenda o emprego de uma testagem confirmatória suplementar. Para atender essa demanda, aplicam-se ensaios de testagem complementar para HIV-2 desenvolvidos por laboratórios e centros de referências, como INNO-LIA HIV 1/2 fabricado pela INNOGENETICS NV, Teste HIV 1/2 Blot da MP Biomedicals e outros (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011).

Testes de *imunoblot* comerciais que apresentam as proteínas gp140, gp105 e/ou gp36 do HIV-2, além das proteínas p24, p31, gp41, gp120 e/ou gp160 do HIV-1 têm sido um recurso na identificação de casos prováveis de infecção pelo HIV-1/2. No entanto, devido ao seu alto custo e à falta de informação sobre sua real especificidade na identificação de casos verdadeiramente positivos, ainda há uma limitação no seu uso rotineiro (LEMEY et al., 2003; TORIAN et al., 2010).

A PCR é, muitas vezes, utilizada como um teste confirmatório para o diagnóstico da infecção pelo HIV-2, porém esta metodologia ainda permanece na área da pesquisa, uma vez que não há testes aprovados pela FDA e comercialmente disponíveis para quantificação do RNA de HIV-2 (LEMEY et al., 2003; TORIAN et al., 2010).

Usualmente, o monitoramento dos pacientes infectados pelo HIV-1 é feito com a quantificação de RNA viral e contagem de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Em um estudo de coorte francês realizado entre maio de 1994 e dezembro de 2000 com 217 pacientes, 48% foram detectados com teste de RT-PCR com CV média de 3 logs (1000 cópias/mL). Logo, a carência de testes moleculares comerciais adequados dificulta tanto o diagnóstico como o tratamento desses pacientes (MATHERON et al., 2003).

Dado o quadro atual de presença da infecção pelo HIV-2 em diferentes partes dos continentes africano, europeu, países como Índia, Estados Unidos e Brasil, é relevante a testagem sorológica para HIV-2 em indivíduos vulneráveis ou com resultados indeterminados/incomuns de *Western Blot* HIV-1.

#### 1.8.5 Recomendações para diagnóstico do HIV-2 no Brasil

As recomendações para diagnóstico da infecção pelo HIV-2 no Brasil têm como base as indicações internacionais para indivíduos que apresentam risco epidemiológico de infecção por esse tipo de vírus. São eles os que têm parceiros sexuais sabidamente infectados pelo HIV-2 ou oriundos de países onde o HIV-2 é endêmico; que tenham realizado transfusões de sangue, compartilhamento de agulhas ou injeções com agulhas não estéreis em países onde o HIV-2 é endêmico; filhos de mulheres que apresentam fatores de risco para o HIV-2 (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

Além dos casos verificados na anamnese, a suspeita de infecção por HIV-2 em situações devem ser analisadas individualmente, como: 1) certos resultados na testagem laboratorial com testes sorológicos de triagem positivo e *Western Blot* ou teste molecular negativo, com um elo epidemiológico com países endêmicos para HIV-2; 2) um perfil sintomatológico típico de AIDS com 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, bandas da polimerase p66, p51 (transcriptase reversa) ou p31 (integrase); 3) pacientes com CV indetectável, com sintomatologia ou contagem de linfócitos TCD4+ decrescente; 4) testes sorológicos que indiquem reatividade para a proteína gp36 ou gp105 do HIV-2 (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

A Portaria nº 29 de 17 de Dezembro de 2013 estabelece que o diagnóstico definitivo de infecção pelo HIV-2 somente poderá ser emitido pelo Laboratório de Referência Nacional para HIV-2, devendo ser respeitados os procedimentos recomendados pelo Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV, para que seja providenciado o remanejamento da amostra suspeita, a fim de que o Laboratório de Referência Nacional confirme o diagnóstico (BRASIL, 2015).

O diagnóstico precoce da infecção pelo HIV é uma questão essencial de saúde pública, uma vez que a fase aguda representa o intervalo de tempo de maior infecciosidade e, conseqüentemente, transmissão viral. Estudos demonstram que um número significativo de novos casos de infecção são oriundos de indivíduos recém-infectados, que, no geral, apresentam altos níveis de RNA viral plasmático. O conhecimento da própria infecção e o início do tratamento adequado de acordo com o tipo viral são formas efetivas de intervenção preventiva e controle epidemiológico (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar a interpretação do diagnóstico de HIV-2 entre dois testes sorológicos confirmatórios que utilizam proteínas de HIV-2 em amostras de pacientes HIV reativos atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) no período do ano de 2000 até 2015.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Testar as amostras caracterizadas como HIV positivas do biorrepositório HUGG/UNIRIO para confirmar o resultado dos testes sorológicos realizados quando do diagnóstico do paciente e a permanência de reatividade;
- Comparar a reatividade das amostras de pacientes às proteínas de HIV-2 nos testes rápidos DPP Geenius HIV 1/2 da Bio-rad e DPP *Imunoblot* HIV 1/2 de Bio-Manguinhos;
- Analisar a concordância entre as leituras visuais e automatizadas do TR DPP Geenius HIV.

### 3 JUSTIFICATIVA

A presença do HIV-2 em uma determinada população demanda testes laboratoriais específicos para o seu diagnóstico. Atualmente, os testes sorológicos comercialmente disponíveis não discriminam entre as duas infecções de modo específico e, adicionalmente, não existe um teste molecular comercial para esse fim.

O HIV-2 possui um padrão de susceptibilidade e resistência às drogas antirretrovirais diferente do verificado para o HIV-1. Na maior parte dos países, os regimes terapêuticos com fármacos antirretrovirais são especificamente determinados para tratar infecções por HIV-1.

Portanto, identificar a infecção pelo HIV-2 pode possibilitar a introdução de regimes terapêuticos mais apropriados que evitem o surgimento de estirpes virais resistentes. Assim, o diagnóstico correto da infecção pelo HIV-2 tem implicações para o manejo clínico, tratamento do paciente e controle epidemiológico.

As informações a respeito da prevalência do HIV-2 no Brasil ainda são escassas. A maioria dos estudos de vigilância epidemiológica publicados fazem uso de metodologias e “kits” de diagnóstico que não discriminam entre as infecções causadas pelo HIV-1 e HIV-2.

Adicionalmente, nas duas últimas décadas houve um aumento considerável do número de africanos visitando ou vivendo no Brasil, devidos aos vínculos sócio-culturais e econômicos afro-brasileiros. Este movimento migratório pode ter facilitado a introdução e dispersão do HIV-2 no país.

O presente estudo busca realizar uma análise comparativa entre dois testes sorológicos confirmatórios para detecção de HIV-2. Essas informações podem nortear as recomendações sobre a testagem sorológica do HIV-2 a partir dos resultados de reatividade cruzada entre os anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2, levando a um rastreamento mais eficiente de possíveis casos de infecção pelo HIV-2.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, envolvendo a análise de amostras de HIV reativas de um biorrepositório do Laboratório de Pesquisa em Imunologia e AIDS (LAPIA) do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG). O período a ser estudado inclui o quantitativo de 633 amostras HIV reativas coletadas entre os anos de 2000 até 2015, com volume suficiente e viabilidade para as análises.

### 4.2 Testes sorológicos para o HIV-2

A testagem laboratorial das amostras foi realizada da seguinte forma:

1) As amostras do biorrepositório com resultado de ELISA HIV reativo tiveram suas caracterizações sorológicas confirmadas com Teste Rápido DPP *Imunoblot* HIV 1/2 de Bio-Manguinhos em uma triagem inicial para confirmação da permanência de reatividade. Amostras com resultados discordantes, comparando-se os atuais do estudo com aqueles contemporâneos à entrada no laboratório, também foram avaliadas frente ao *Western Blot*,

2) Em seguida, as amostras que apresentaram reatividade à gp36 (amostras não diluídas) no TR DPP *Imunoblot* HIV 1/2 de Bio-Manguinhos, que é um dos testes confirmatórios recomendados pelo Ministério da Saúde, foram também submetidas ao TR DPP Geenius da Bio-rad que utiliza duas bandas de reatividade para HIV-2 (gp36 e gp140) e ao leitor automatizado Geenius de reatividade, para análise comparativa dos resultados obtidos nas duas metodologias de diagnóstico sorológico de HIV-2.

Ademais, também foram analisadas a concordância das interpretações visuais em relação à leitura automatizada das bandas de HIV-2 do TR DPP Geenius. A leitura visual foi realizada por dois profissionais treinados e, em casos de discordância, por um terceiro leitor.

Ao final desta etapa de testagem, as amostras que apresentaram reatividade específica à gp36 (amostras não diluídas) no TR DPP *Imunoblot* HIV 1/2 de Bio-Manguinhos foram testadas em um ensaio do tipo ELISA desenvolvido no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (pepEIE

HIV-1/2), um ensaio tipo-específico que permite a identificação de reatividade ao antígeno gp36 do HIV-2 (MAUEIA et al., 2011).

A reatividade à gp36 foi confirmada ou não com um ensaio de neutralização, segunda etapa do ensaio pepEIE HIV-1/2, possibilitando a distinção de reações cruzadas por semelhanças antigênicas entre esses dois vírus (Figura 10).

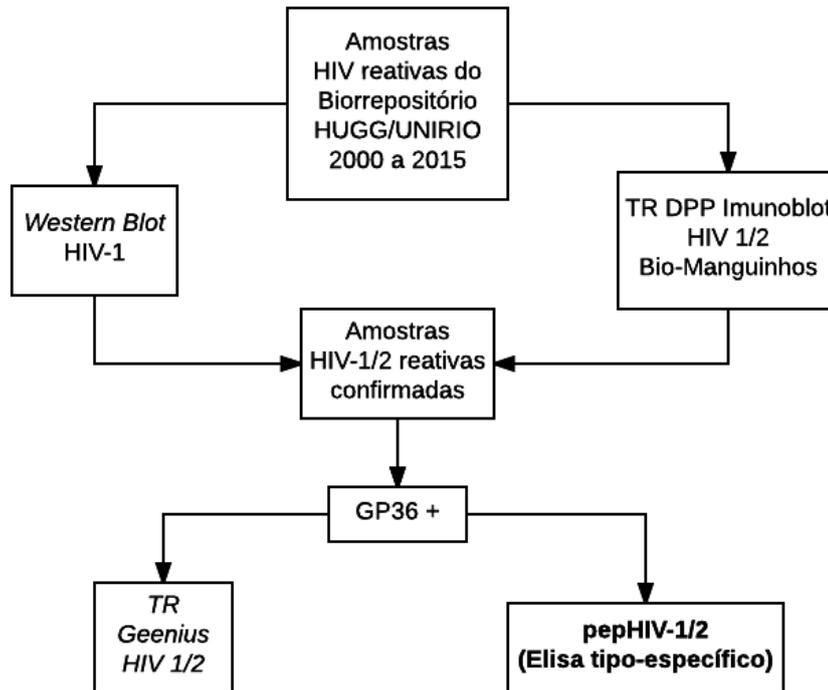


FIGURA 10 – FLUXO DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

FONTE: Elaborada pela autora, 2017

#### 4.2.1 Procedimento de testagem com TR DPP Imunoblot HIV 1/2 de Bio-Manguinhos

Para a detecção de anticorpos anti-HIV no soro foi utilizado o teste rápido TR DPP *Imunoblot* HIV 1/2 de Bio-Manguinhos (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde), de acordo com as instruções do fabricante.

O procedimento básico de realização da testagem envolve a aplicação da amostra e tampão no poço 1 (5µl da amostra e 2 gotas do tampão), que migram em direção aos antígenos fixados na janela de leitura. Após um período de tempo que possibilitará a dispersão dos anticorpos anti-HIV 1/2 presentes na amostra e sua interação com os antígenos fixados, o tampão será adicionado no poço 2 (5 gotas) e

carreará o conjugado, composto pela proteína A e partículas de ouro coloidal (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

O conjugado irá interagir com os anticorpos complexados e haverá a visualização na membrana de nitrocelulose das linhas rosas ou purpuras, de acordo com o complexo antígeno-anticorpo formado. Os resultados são interpretados conforma a Figura 11 (FERREIRA-JUNIOR et al., 2014).

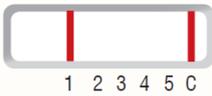
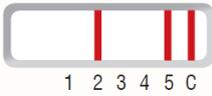
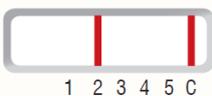
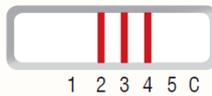
<p><b>Resultado não reagente:</b> Presença de cor rosa/roxa apenas na linha de controle (C).</p>	<p>Área 3</p>  <p>1 2 3 4 5 C</p>
<p><b>Resultado reagente para HIV-2:</b> Presença de cor rosa/roxa na linha de controle (C) e na linha de teste 1. Eventualmente pode aparecer linha em 1 (gp36), 5 (p24) e em C (controle).</p>	<p>Área 3</p>  <p>1 2 3 4 5 C</p>
<p><b>Resultado reagente para HIV-1:</b> Presença de cor rosa/roxa na linha de controle (C) e em duas ou mais linhas (2, 3, 4 ou 5).</p>	<p>Área 3</p>  <p>1 2 3 4 5 C</p> <p>Área 3</p>  <p>1 2 3 4 5 C</p>
<p><b>Resultado indeterminado para HIV-1:</b> Presença de cor rosa/roxa na linha de controle (C) e em somente uma linha (2, 3, 4 ou 5).</p>	<p>Área 3</p>  <p>1 2 3 4 5 C</p>
<p><b>Teste inválido:</b> quando NÃO apresentar a linha na área de controle.</p>	<p>Área 3</p>  <p>1 2 3 4 5 C</p>

FIGURA 11 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE TR DPP *IMUNOBLOT* HIV 1/2

FONTE: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014

#### 4.2.2 Procedimento de testagem com TR *Geenius* HIV e Software *Geenius*

O ensaio confirmatório TR *Geenius* HIV 1/2 da Bio-rad é um teste imunocromatográfico em moldes semelhantes ao TR DPP *Imunoblot* HIV-1/2 de

Bio-Manguinhos, sendo a principal diferença residente na existência de uma banda adicional para diferenciação da infecção pelo HIV-2 (gp36 e gp140 de HIV-2).

O suporte do ensaio contém anticorpos ligados à proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos impregnados na fase sólida. A amostra (5µL do soro) é aplicada no Poço 1 juntamente com o tampão (2 gotas) para promover o descolamento de espécimes e reagentes, facilitando a ligação antígeno-anticorpo. Após a migração para a tira de teste, em cerca de 5-7 minutos, adiciona-se o tampão no Poço 2 (5 gotas) que carreará o conjugado e possibilitará a visualização das linhas de teste (caso haja anticorpos anti-HIV) e linha controle.

O critério de interpretação dos resultados obtidos no teste é apresentado na Figura 12.

Interpretação HIV-1	
Positivo	2 bandas das 4 de HIV-1, sendo pelo menos 1-ENV gp160 (banda4) ou gp41 (banda6)
Negativo	sem bandas
Indeterminado	Apenas 1 ENV (banda 4 ou 6) ou
	1 GAG (banda 5) ou
	1 POL (banda 3) ou
	1 GAG com 1 POL (banda 5 e 3)

Interpretação HIV-2	
Positivo	2 bandas de HIV-2 devem estar presentes: gp36 e gp140 (bandas 1 e 2)
Negativo	sem bandas
Indeterminado	Apenas 1 ENV gp36 (banda 1) ou gp140 (banda 2):

FIGURA 12 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS INDIVIDUAIS TR GEENIUS HIV 1/2

FONTE: Modificado a partir de Bio-Rad, 2016b.

LEGENDA: O dispositivo TR Geenius HIV 1/2 apresenta uma banda controle e seis linhas de teste correspondentes às bandas gp36 e gp140 de HIV-2 (ENV); banda p31 de HIV-1 (POL); banda gp160 de HIV-1 (ENV); banda p24 de HIV-1 (GAG); banda gp41 de HIV-1 (ENV).

Uma vez obtidos os resultados individuais das bandas de HIV-1 e HIV-2,

parte-se para os critérios de interpretação global do ensaio (Figura 13).

Resultado HIV-2	Resultado HIV-1	Interpretação Final do Ensaio
Negativo	Negativo	HIV NEGATIVO
Indeterminado	Negativo	HIV-2 INDETERMINADO
Negativo	Indeterminado	HIV-1 INDETERMINADO
Indeterminado	Indeterminado	HIV INDETERMINADO
Negativo	Positivo	HIV-1 POSITIVO
Indeterminado	Positivo	HIV-1 POSITIVO
Positivo	Negativo	HIV-2 POSITIVO
Positivo	Indeterminado	HIV-2 POSITIVO
Positivo	Positivo	HIV-2 POSITIVO
	1 ENV (gp160 ou gp41) + GAG ou POL	
	2 ENV (gp160 e gp41) ± GAG ou/e ± POL	HIV POSITIVO NÃO TIPIFICADO

FIGURA 13 – CRITÉRIO DE INTERPRETAÇÃO GLOBAL HIV 1/2 TR GEENIUS HIV 1/2

FONTE: Modificado a partir de BIO-RAD, 2016b.

O *Software* Geenius para leitura automatizada detecta presença ou ausência das bandas do dispositivo relacionadas com a presença ou não de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2, gerando resultados positivos, negativos e indeterminados para HIV-1 e HIV-2, de acordo com os critérios anteriormente mencionados. O sistema faz uso de controles internos para validação das leituras, apresenta codificação única para cada dispositivo de reação, rastreabilidade das calibrações do sistema e possibilita registro fotográfico das bandas detectas ou não nos suportes.

#### 4.2.3 Procedimento de testagem *New Lav Blot I*, *Bio-Rad*

As tiras de nitrocelulose do teste do ensaio *New Lav Blot I* da *Bio-Rad* contêm as proteínas do vírus HIV-1 e um controle interno localizado na extremidade inferior não numerada da tira, que permite validar a adição da amostra e dos reagentes, além de assegurar a realização do protocolo correto do ensaio. O teste compreende as seguintes etapas:

- a) reidratação das tiras com solução de lavagem/diluyente;
- b) incubação dos controles e das amostras que serão analisadas, na proporção 1:1000. Se existirem anticorpos anti-HIV-1, eles se ligarão às proteínas virais impregnadas nas tiras;
- c) após as lavagens para retirada do material que não se ligou à tira, é

realizada a incubação com anticorpos anti-IgG humanos marcados com fosfatase alcalina, que interagirá com os complexos antígenos-anticorpos retidos no suporte sólido;

d) outras lavagens com a solução tampão são realizadas para eliminar o conjugado excedente. Emprega-se a solução de revelação e, mediante atividade enzimática, ocorrerá o aparecimento de bandas específicas para cada proteína do HIV-1 (Figura 14).

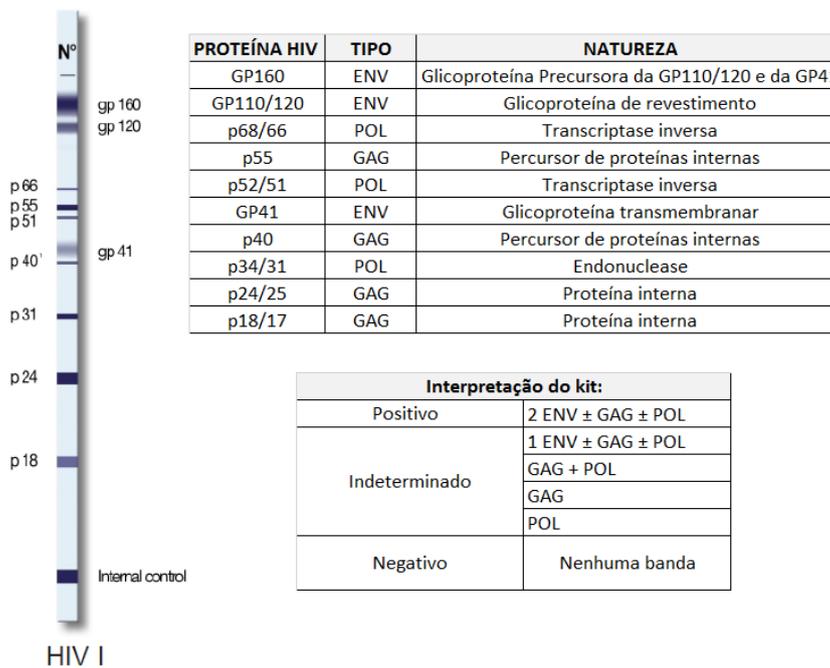


FIGURA 14 – PROTEÍNAS VIRAIS E INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO *NEW LAV BLOT I*, BIO-RAD  
 FONTE: Modificado a partir de Bio-Rad, 2016.

#### 4.2.4 Ensaio imunoenzimático (pepEIE) HIV-1/2 LVM

##### a) Procedimento de testagem com pepEIE HIV-1/2 LVM

O pepEIE HIV-1/2 é baseado em peptídeos sintéticos específicos e derivados das regiões imunodominantes da gp41 do HIV-1 e de gp36 do HIV-2. Os peptídeos sintéticos representam as sequências de consenso do HIV-1 grupo M e as sequências de regiões homólogas do HIV-2. Os peptídeos de 21-mer são 1) HIV-1 grupo M = RGDKDGGGLGIWGCSSGKLICTT e 2) HIV-2 = RGDKDGGGLNSWGCAFRQVCHT.

As microplacas de 96 orifícios do tipo polivinil (Immulon II; Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, Va.) foram recobertas com 5 µg/mL de peptídeo

sintético (100 µl/orifício) em tampão carbonato (pH 9,6) e incubado overnight a 4°C, sendo uma placa específica para HIV-1 e outra para HIV-2. As placas serão lavadas 6 vezes com tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0,05% Tween 20. Os sítios livres de peptídeo foram bloqueados com a adição de uma solução contendo 5% de albumina bovina em PBS/Tween.

Após o preparo das placas de reação, foi adicionado o soro dos pacientes diluídos 1/100 nas microplacas para HIV-1 e HIV-2, em posições idênticas nas duas bases de reação, e incubadas por 1h a 37°C. Após 5 lavagens com PBS/Tween, foi adicionado um anticorpo de cabra anti-Imunoglobulina G humana, específico para a região Fc, conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, Mo.). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, foi adicionado 100 µl/orifício de TMB (3,3',5,5' base tetrametilbenzidina, Sigma, St. Louis, Mo.).

As placas foram lidas após 25 min de incubação em temperatura ambiente no escuro. A reação foi pausada com 100µl/poço de ácido sulfúrico 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e as leituras realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. O *cut-off* do ensaio foi determinado da seguinte forma:  $Y \times 2$ , em que Y é a média das triplicatas dos controles negativos internos (soro normal, de indivíduos não infectados, padronizado para a técnica). Todo o ensaio conta com um controle positivo específico para HIV-2 e para HIV-1.

## b) Preparação dos reagentes da pepEIE HIV-1/2 LVM

### 1. Solução de Lavagem

As lavagens foram realizadas com uma solução de 1 pacote de PBS 0,05% Tween 20 (10g) em 1L de H<sub>2</sub>O Milli Q.

### 2. Diluente de amostra

Feito a partir de 0,0045g Púrpura Bromocresol com 100mL de PBS 0,05% Tween 20 2% de proteína albumina do soro bovino (BSA), dissolvido sob agitação e armazenado em 2°C a 8°C por 6 meses. O tampão PBS 0,05% Tween 20 2% BSA é preparado pelo adição de 2g BSA em 100mL de tampão de lavagem.

### 3. Diluente do anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado

A solução estoque (0,6%) é feita 0,6g amarelo crupúsculo com 100mL de H<sub>2</sub>O Milli Q, dissolvido sob agitação e armazenado sob refrigeração (2°C a 8°C) por 6 meses. Para uso no ensaio, emprega-se a solução a 0,006% com a diluição de 1mL da solução estoque 0,6% em 99mL de PBS 0,05% Tween 20.

#### c) Procedimento de neutralização com pepEIE HIV-1/2 LVM

Para etapa de neutralização, os peptídeos sintéticos das sequências de consenso do HIV-1 grupo M (gp41) e de sequências de regiões homólogas do HIV-2 (gp36) foram incubados com as amostras diluídas do soro, a fim de verificar reatividade cruzada de anticorpos. Em seguida, o procedimento de testagem realizado na etapa anterior foi repetido.

### 4.3 Coleta e análise estatística dos dados

As informações obtidas para o estudo foram 1) dados demográficos de idade, sexo e nacionalidade dos pacientes; 2) dados laboratoriais de testes sorológicos realizados por ocasião do diagnóstico ou quando do registro do paciente no HUGG, dados sobre a quantificação de linfócitos TCD4+, TCD8+ e carga viral. Todas essas informações foram colhidas em formulário apropriado e posteriormente digitadas em uma base de dados, utilizando uma planilha do *Software* Microsoft Excel.

A análise estatística foi efetuada por meio do Programa *Software* R, versão 3.3.3. Empregaram-se técnicas de Estatística Descritiva para caracterizar as amostras estudadas, sendo os dados quantitativos analisados a partir de medidas de tendência central, aplicada a média ou a mediana de acordo com o padrão de simetria da distribuição de frequência dos dados, e de dispersão para estimar a variabilidade existente nos dados. As variáveis qualitativas foram descritas em relação às frequências absolutas e relativas.

As associações entre as variáveis foram analisadas através do Teste Wilcoxon-Mann-Whitney. Com o propósito de manter a cientificidade da pesquisa, o

presente estudo admitirá o nível de significância de  $p < 0,05$ , isto é, 95% de probabilidade de que estejam certas as afirmativas e/ou negativas denotadas durante as investigações, admitindo-se, portanto, a probabilidade de 5% para resultados obtidos por acaso.

As análises comparativas de reatividade das bandas de HIV-2 dos Testes Rápidos e da confiabilidade das leituras automatizada e visual do TR DPP Geenius HIV foram realizadas pela estatística Kappa de Cohen e classificadas segundo Landis & Koch (1977), de acordo com os graus de concordância:  $k < 0$  ausência de concordância;  $0 < k < 0,19$  concordância pobre;  $0,2 < k < 0,39$  concordância regular;  $0,4 < k < 0,59$  concordância moderada;  $0,6 < k < 0,79$  concordância substancial;  $0,8 < k < 1,0$  concordância quase perfeita.

#### **4.4 Considerações éticas e orçamentárias**

As amostras biológicas utilizadas neste projeto fazem parte do biorrepositório do Laboratório de Pesquisa em Imunologia e AIDS do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (LAPIA/HUGG/UNIRIO), para o qual foi concedido aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUGG (CEP-HUGG), memorando número 07/2015. O presente trabalho foi aprovado pelo CEP-HUGG, número do parecer 1.349.374/2015.

Todos os custos de testes e reagentes utilizados neste estudo foram de responsabilidade do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## 5 RESULTADOS

Das aproximadamente 18.737 amostras analisadas no HUGG/UNIRIO de 2000 a 2015, 3560 foram diagnosticadas como HIV reativas, com uma média anual de 19% de reatividade ao HIV. Puderam ser recuperadas 659 amostras a partir do biorrepositório do LAPIA/HUGG/UNIRIO, que representam 18,5% das amostras HIV reativas desse período de 15 anos.

A primeira etapa do projeto consistiu na testagem das amostras para verificação da permanência de reatividade, isto é, a presença de anticorpos detectáveis nas metodologias sorológicas e confirmação dos resultados quando do diagnóstico do paciente ou do registro do paciente no HUGG.

Todas as amostras passaram por análises através do TR DPP *Imunoblot* HIV 1/2 de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e algumas foram submetidas à testagem complementar com *Western Blot New Lav Blot I* da Bio-Rad para confirmação da caracterização sorológica, nos casos de perfis de reatividade ao HIV inferiores aos inicialmente registrados no momento do diagnóstico no HUGG.

Do quantitativo de 659 amostras armazenadas no biorrepositório, 26 amostras do biorrepositório estavam inviáveis ou não possuíam volumes suficientes para a testagem e foram descartadas da coorte de estudo. As 633 amostras restantes tiveram suas caracterizações sorológicas como HIV reativas confirmadas, tendo 25 dessas amostras perfis de reatividade à HIV com menor intensidade nas análises do presente estudo em comparação aos resultados inicialmente inseridos no sistema de registro laboratorial.

Ao final dessa análise, 633 amostras tiveram suas caracterizações como HIV positivas confirmadas, tendo 59 amostras (sem diluição) anticorpos reativos à banda gp36 de HIV-2 no TR DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos (Figura 15).

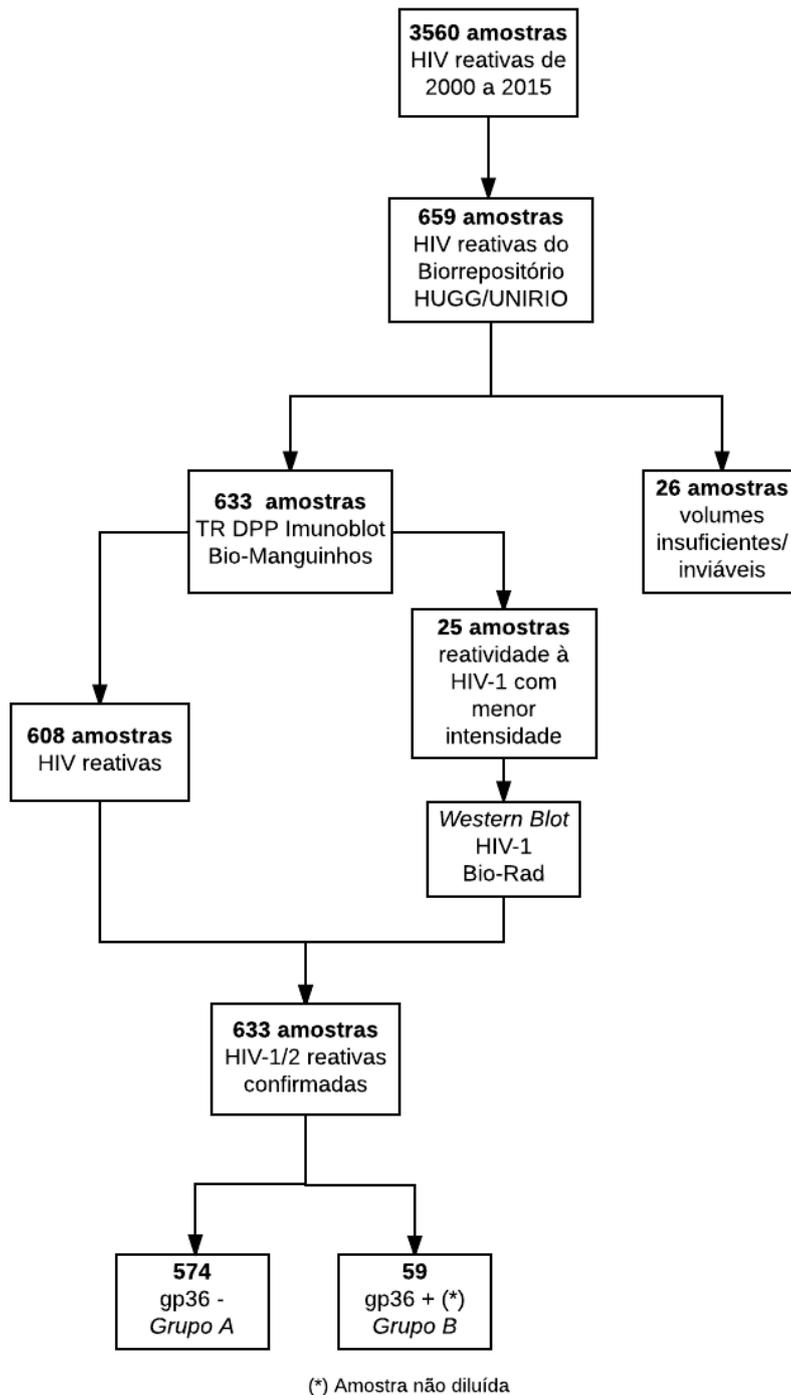


FIGURA 15 – RESULTADOS DA TESTAGEM DE REATIVIDADE AO HIV

FONTE: Elaborado pela autora, 2017

Para a análise comparativa dos resultados dos testes rápidos confirmatórios TR DPP *Imunoblot* Bio-Manguinhos e TR DPP *Geenius* foram empregadas as amostras do Grupo B (59 amostras reativas à gp36) de pacientes com idade média de 35,3 anos (DP = 9,9), sendo 36 homens (61%) e 23 mulheres (39%), todos brasileiros.

A idade média dos pacientes do Grupo A (574 amostras HIV reativas) foi 34,51 anos (DP=15,13), sendo 292 homens (50,9%).

Na Tabela 1 foram descritos os ensaios imunoenzimáticos automatizados, realizados por ocasião do diagnóstico ou quando do registro do paciente no HUGG, empregados nas 59 amostras reativas para a gp36 durante os 15 anos de testagem para HIV e armazenamento de amostras.

**Tabela 1: Ensaios imunoenzimáticos empregados no diagnóstico de HIV nas 59 amostras GP36 reativas no HUGG/UNIRIO**

Ensaio	Período utilizado <sup>1</sup>	Valor médio DO/CO	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de amostras avaliadas
Access HIV Combo da Bio-rad	2015	440,72	458,18	428,42	3
VIDAS Duo Ultra Biomérieux	2014-2013	628,43	1863,08	65,52	21
VIDAS HIV-DUO Biomérieux	2008-2004	43,27	50,54	33,17	13
Access New da Bio-rad	2008-2003	128,29	222,16	22,8	24
ROCHE	2001-2000	19,02	19,02	19,02	17
GS HIV Combo Ag/Ab	2001-2000	21,64	22,01	16,06	17

<sup>1</sup> Nos períodos sobrepostos foram adotados dois ensaios imunoenzimáticos para avaliação das amostras na rotina de diagnóstico de HIV do LAPIA/HUGG

As medianas das quantificações de linfócitos TCD4+ dos Grupos A e B foram 353 células/mm<sup>3</sup> (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> = 170,0 – 545) e 357 células/mm<sup>3</sup> (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> = 169,5 – 538), respectivamente, p-valor = 0.9393. A quantificação de linfócitos TCD8+ do Grupo A apresentou valor de 843 células/mm<sup>3</sup> (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> = 596,0–1241,0) e 884 células/mm<sup>3</sup> para o Grupo B (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> = 652,0 – 1262,5), p-valor = 0.507. Somente 313 amostras do Grupo A e 35 do Grupo B tiveram seus valores de quantificação de populações TCD4+/TCD8+ recuperados nos sistemas de registro laboratoriais.

A mediana da CV do Grupo A foi 24.497 cópias/mL (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> = 4.400 – 110.000) e do Grupo B foi 20.000 cópias/mL (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> = 5.930,5 – 44.827), p-valor 0.7965. Do Grupo A, 69 amostras (22%) possuíam CV HIV-1 não detectável ou abaixo do limite de detecção da técnica de quantificação viral e sete amostras (20%) do Grupo B apresentaram o mesmo perfil. Logo, não houve diferença significativamente estatística na quantificação de TCD4+, TCD8+ e RNA plasmático de HIV-1 entre os grupos de amostras A e B.

As amostras do Grupo B foram submetidas à análise no TR DPP Geenius através do procedimento de leitura automatizada e interpretação visual. A presença

da infecção pelo HIV-2 nessa metodologia é atribuída à detecção simultânea de gp36 e gp140.

No TR DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos, o resultado reagente para HIV-2 é obtido mediante a reatividade somente à gp36 e são necessárias etapas de diluições (1:10 e 1:100) para diferenciação entre os vírus HIV-1 e HIV-2, caso haja duas ou mais linhas correspondentes às proteínas de HIV-1. E, de acordo com a recomendação de diagnóstico de infecção por HIV do Ministério da Saúde, o diagnóstico definitivo de infecção pelo HIV-2 somente poderá ser emitido pelo Laboratório de Referência Nacional para HIV-2 com o uso de análises tipo-específicas.

As amostras sem diluições do Grupo B testadas nos testes rápidos confirmatórios DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos e Geenius foram concordantes em relação à detecção da proteína de HIV-2 gp36 em 10 das 59 amostras, coeficiente *Kappa* considerado ausente (<0,0).

A diluição 1:10 das 59 amostras para o TR DPP *Imunoblot* reduziu a reatividade à gp36 a 10 casos, mas a ausência de detecções na banda gp36 de HIV-2 foi obtida somente na diluição 1:100.

No TR Geenius, houve reatividade à gp140 em duas amostras não diluídas (Tabela 2), mas sem ocorrência simultânea da gp36 (critério para emissão de resultado HIV-2 reativo).

Tabela 2: Reatividade às bandas de HIV-2 nos testes rápidos DPP <i>Imunoblot</i> Bio-Manguinhos HIV versus DPP Geenius HIV <sup>1</sup>					
Diluição da Amostra	TR DPP <i>Imunoblot</i> HIV	TR DPP Geenius HIV			
	GP36+	GP36+ GP140+	GP36+ GP140-	GP36- GP140+	GP36- GP140-
Não Diluída	59	<b>0</b>	10	2	47
1:10	10 (5) <sup>2</sup>	-	-	-	-
1:100	<b>0</b>	-	-	-	-

<sup>1</sup> Todas as amostras apresentaram resultados negativos para HIV-2 no pepEIE HIV-1/2.

<sup>2</sup> Cinco das 10 amostras também apresentaram reatividade à gp36 nas análises frente ao TR Geenius sem diluições.

As interpretações visuais e as leituras automatizadas do TR DPP Geenius demonstraram uma concordância quase perfeita (coeficiente *Kappa* =0,89) em relação às bandas de HIV-2, sendo as discrepâncias relacionadas a bandas reativas fracas (Tabela 3), que não interferiram no resultado da análise, segundo os critérios do fabricante.

<b>Tabela 3: Discordância entre os anticorpos detectados pelo TR Geenius HIV-1/2 nas leituras e interpretações visuais e automatizadas na amostra A15</b>			
	pepEIE HIV-1/2	TR Geenius Visual	TR Geenius Automatizado
	Resultado HIV-2	Resultado HIV-2	Resultado HIV-2
gp36	Negativo	Negativo	Negativo
gp140	-	Positivo	Negativo

As amostras foram caracterizadas com o pepEIE HIV-1/2 (LVM/UFRJ), um ELISA tipo-específico referencial para o diagnóstico do HIV-2, e apresentaram resultados negativos para HIV-2.

## 6 DISCUSSÃO

Os testes rápidos representam um avanço na prevenção e controle do HIV/AIDS, sendo empregados em diferentes situações, como triagem sorológica de sangues de doação e garantia da segurança transfusional, estudos de vigilância epidemiológica e realização de diagnósticos de infecção pelo HIV em contextos diversos. Os TRs são de fácil execução, podem ser realizados fora do ambiente laboratorial, apresentam alta sensibilidade de acordo com o fabricante e interpretação prática.

Os usuários dos serviços clínicos e de diagnóstico de HIV oferecidos pelo HUGG, um hospital universitário integrante dos serviços terciários do Sistema Único de Saúde, são oriundos de todo o município do Rio de Janeiro de acordo com os dados de Signorini (2004). Contudo, distribuem-se em maior proporção pelas regiões administrativas da zona sul, em direção à zona norte até os limites da zona oeste da cidade.

O HUGG presta também assistência a um grande número de pacientes moradores das cidades adjacentes, região da Baixada Fluminense. As amostras utilizadas na presente pesquisa são oriundas dessa população diversificada atendida pelo Hospital.

A partir de amostras oriundas de pacientes do HUGG foi desenvolvida a primeira publicação de infecções pelo HIV-2 no Brasil através de análises moleculares pela técnica de PCR com sondas específicas para o HIV-2, Pieniazek e colaboradores em 1991, identificando-se duas coinfeções HIV-1/HIV-2.

Das 3.560 amostras HIV reativas diagnosticadas no LAPIA/HUGG no período de 2000 a 2015, 659 amostras (18,5%) foram recuperadas a partir do biorrepositório HUGG/UNIRIO, sendo 26 descartadas por não apresentarem volumes suficientes ou viabilidade para as análises seguintes. As caracterizações sorológicas como HIV reativas foram confirmadas em 633 amostras.

As reatividades com menor intensidade verificadas nas análises do estudo em 25 amostras HIV reativas, discrepantes dos registrados iniciais de diagnóstico da infecção no HUGG, poderiam ser atribuídas a uma degradação do material, ocasionada pela conservação inadequada durante o longo período de armazenamento. Tal fato é corroborado pelo contraste entre resultados mais acentuado nas amostras dos anos de 2000 e 2001.

Apesar dos dados que mostram a presença do HIV-2 no Brasil e da ocorrência de transmissão viral regional, não há suficientes informações acerca da circulação de HIV-2 e da prevalência de coinfeções HIV-1 e HIV-2 na população brasileira. A presença de reatividade cruzada nas metodologias de diagnóstico dificulta um registro epidemiológico mais acurado. Essas reações inespecíficas observadas em técnicas de sorodiagnóstico podem estar relacionadas com características do indivíduo e suas enfermidades (por exemplo, infecções oportunistas), condições clínicas específicas (doenças autoimunes, oncológicas) e características intrínsecas à metodologia de diagnóstico empregada na análise.

A reatividade cruzada ao HIV-2 foi observada em 59 das 633 amostras não diluídas analisadas no TR DPP *Imunoblot* (9,32%). A diluição 1:10 das amostras para o TR DPP *Imunoblot* reduziu a detecção para 10 casos e a ausência de reação foi obtida na diluição 1:100 de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante do produto.

Embora este fato não tenha acontecido neste estudo, a estratégia de diluir para “resolver” a diferenciação entre HIV-1 e HIV-2 do “kit” é questionável, pois propõe a diluição relativa de anticorpos para os dois vírus. No entanto, na ocorrência de dupla infecção em que uma delas seja recente ou, alternativamente, na presença de títulos baixos de anticorpos, a simples diluição das amostras acarretaria um resultado falso-negativo. Por tal razão, o próprio fabricante não a considera uma estratégia definitiva e recomenda que a amostra em reatividade à gp36 seja confirmada por outros métodos.

O grupo de amostras empregadas nas análises comparativas dos resultados dos testes rápidos (Grupo B) em relação ao quantitativo remanescente de amostras HIV reativas (Grupo A), de acordo com a análise dos dados, não apresentou diferenças significativamente estatísticas, a um nível de significância de 5%, na quantificação de TCD4+, TCD8+ e carga viral plasmática de HIV-1. Tal fato indica que os grupos A e B representam um conjunto único de amostras HIV-1 reativas.

As 12 amostras que apresentaram reatividade às proteínas de HIV-2 (10 para gp36 e duas para gp140) não representam o quantitativo total de amostras possivelmente (falso) reagentes para HIV-2, pois somente 59 amostras das 633 reagentes a HIV-1 foram testadas. Desta forma, a especificidade do TR DPP Geenius para detectar a infecção por HIV-2 não pôde ser avaliada.

Após uma melhor definição da especificidade do TR DPP Geenius para detectar a infecção por HIV-2, esse ensaio poderia ser empregado de forma complementar à testagem do TR DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos no fluxograma de identificação das infecções por HIV-1 e HIV-2. Tal procedimento seria uma alternativa para lugares de acesso remoto e reduziria o envio de amostras com anticorpos anti-HIV-1 com reatividade cruzada aos antígenos de HIV-2 ao Laboratório de Referência.

Todas as 59 amostras do Grupo B apresentaram resultados negativos para HIV-2 no pepEIE HIV-1/2, o ELISA tipo-específico de referência no Brasil. A partir dos critérios propostos pelo fabricante, os testes rápidos confirmatórios DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos e DPP Geenius foram concordantes com esses resultados.

As interpretações visuais das reações no TR DPP Geenius apresentaram concordância quase perfeita (coeficiente Kappa = 0,89) com as leituras automatizadas. Adicionalmente, isso representa uma redução nos custos com maquinários e manutenções de equipamentos onerosos ao serviço público, mas seu uso também pode, em algumas circunstâncias, contornar a subjetividade em análises de resultados dos TR de acordo com as particularidades do serviço de saúde.

O emprego do teste rápido imunocromatográfico com uma banda de testagem não propicia um resultado tipo-específico de HIV definitivo, não sendo evidente se uma possível banda indicativa de anticorpos anti-HIV-2 aponta presença de epítomos comuns dos vírus HIV-1 e HIV-2 ou uma possível coinfeção, algo que somente é evidenciado com triagens mais específicas.

O Manual de Diagnóstico de infecções HIV/AIDS do Ministério da Saúde adota a recomendação do envio de amostras com resultados suspeitos para HIV-2 ao laboratório de referência em diagnóstico do HIV-2, Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esses resultados são caracterizados pela presença de bandas indicativas de infecção por HIV-2 nas metodologias confirmatórias, resultados indeterminados reiterados nas testagens sorológicas com exclusão de infecção pelo HIV-1 e presença de vínculo com as regiões endêmicas de HIV-2 na África.

Ademais, pode-se vislumbrar outra hipótese de envio para o laboratório de

referência. Poder-se-ia incorporar como recomendação de testagem para situações de risco de infecção pelo HIV-2 o monitoramento de pacientes em tratamento para HIV-1 com um perfil sintomatológico típico de AIDS, mas com ausência de resultados positivos para anticorpos anti-HIV-1 ou um *Western Blot* para HIV-1 com os padrões indeterminados/incomuns.

A clínica do paciente e o efeito do longo período de tratamento com antiretrovirais sobre o título global de anticorpos anti-HIV também devem ser considerados na avaliação de uma testagem tipo-específica direcionada ao HIV-2. A identificação do tipo de HIV possibilita o direcionamento correto do tratamento da infecção.

Embora a infecção pelo HIV-2 seja menos agressiva, o HIV-2 possui um padrão de susceptibilidade e resistência às drogas antiretrovirais diferente do verificado para o HIV-1. No Brasil, assim como em outros países, os regimes terapêuticos com fármacos antiretrovirais são especificamente determinados para o tratamento de infecções por HIV-1.

Certo é que existem esquemas terapêuticos específicos para HIV-2. Posto isso, torna-se relevante um correto diagnóstico de diferenciação entre HIV-1 e HIV-2 em pacientes com risco de infecção pelo HIV-2.

Apesar da incidência de HIV-2 declinar na África Ocidental, o crescimento da população mundial e o aumento do fluxo migratório para trabalho, lazer e grandes eventos turísticos, como Copa Mundial de Futebol e Jogos Olímpicos, podem promover a manutenção e disseminação dos vírus para outros países. Destaca-se com isso a necessidade de discutir o impacto da migração na epidemiologia das doenças infecciosas nacionais e a importância de programas de prevenção e diagnóstico de HIV 1/2 mais efetivos, com o uso de fluxos e metodologias de diagnóstico eficientes.

## 7 CONCLUSÕES

- A testagem de amostras HIV reativas não diluídas do biorrepositório do LAPIA/HUGG/UNIRIO do período de 2000 a 2015 no TR *Imunoblot* Bio-Manguinhos apresentou reatividade cruzada ao HIV-2 em cerca de 9,32% das amostras (59 das 633 amostras). No TR DPP Geenius, 12 das 59 amostras demonstraram reatividade às proteínas de HIV-2 (10 para gp36 e 2 para gp140), mas sem a ocorrência de detecção simultânea das proteínas gp36 e gp140, critério para emissão de resultado reativo para HIV-2;
- As análises com os dois testes rápidos imunocromatográficos foram concordantes com o ELISA de referência para diagnóstico de HIV-2 e entre si em relação à detecção da infecção por HIV-2, mas sem a adoção do procedimento de diluição relativa dos títulos de anticorpos para diferenciação entre HIV-1 e HIV-2 no TR DPP Geenius. Além da presença diferencial de duas bandas de testagem para HIV-2 nesse ensaio;
- Os resultados apontaram que testes que utilizam somente uma banda de testagem (uma proteína) para avaliar o HIV-2, como o TR *Imunoblot* Bio-Manguinhos, não podem ser considerados como testes confirmatórios, funcionando como indicativos de infecção. Não fica evidente se uma possível banda sugestiva de anticorpos anti-HIV-2 aponta a presença de epítomos comuns dos vírus HIV-1 e HIV-2 ou uma possível coinfeção;
- O emprego de um teste rápido com duas bandas de testagem para HIV-2 (gp36, gp105 ou gp140 de HIV-2) fornece um grau maior de confiabilidade ao processo de análise ao evitar a diluição da amostra em etapas de discriminação da reatividade cruzada entre anticorpos de HIV-1 e HIV-2, que poderia levar à emissão de resultados falso-negativos em situações de títulos baixos de anticorpos;
- Através do uso de uma coorte mais ampla, a especificidade do TR DPP Geenius para detectar a infecção por HIV-2 poderia ser verificada, de modo a viabilizar a utilização desse ensaio de forma complementar à testagem do TR DPP *Imunoblot* de Bio-Manguinhos no fluxograma de identificação das infecções por HIV-1 e

HIV-2;

- Ademais, pela concordância quase perfeita (coeficiente *Kappa* = 0,89) entre as leituras visuais e automatizadas no TR DPP Geenius, o uso de maquinários nas rotinas de diagnóstico de HIV poderia representar custos dispensáveis ao serviço público com aquisições e manutenções de equipamentos;
- Apesar de a prevalência de HIV-2 declinar na África Ocidental, a integração global pode promover a manutenção e disseminação do vírus para outros países. Ademais, reatividade cruzada entre anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 em metodologias de diagnóstico dificulta o rastreamento epidemiológico da circulação de HIV-2 e da prevalência de coinfeções HIV-1 e HIV-2.
- Além disso, tem-se que o HIV-2 possui um padrão de susceptibilidade e resistência às drogas antirretrovirais diferente do verificado para o HIV-1. Portanto, como na maior parte dos países os regimes terapêuticos com fármacos antirretrovirais são especificamente determinados para tratar infecções por HIV-1, permanece a necessidade do diagnóstico de HIV 1/2 mais efetivo, com o uso de fluxos e metodologias de diagnóstico eficientes.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJORLOLO-JOHNSON, G. M. D. et al. Prospective Comparison of Mother-to-Child Transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. **The Journal of the American Medical Association**, v. 272, n. 6, p. 462–266, 1994.

APETREI, C. et al. Detection and Partial Characterization of Simian Immunodeficiency Virus SIVsm Strains from Bush Meat Samples from Rural Sierra Leone Detection and Partial Characterization of Simian Immunodeficiency Virus SIVsm Strains from Bush Meat Samples from Rural Si. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2631–2636, 2005.

AYOUBAA, A. et al. Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. **AIDS**, v. 27, n. 15, p. 2488–2491, 2013.

BIO-RAD. **New Lav Blot I**. Disponível em:

<<http://www.bio-rad.com/pt-br/product/new-lav-blot-i-new-lav-blot-ii-western-blot-assays>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

BIO-RAD. **Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay**. Disponível em:

<<http://www.bio-rad.com/en-mx/sku/72460-geenius-hiv-1-2-confirmatory-assay>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

BOCK, P. J.; MARKOVITZ, D. M. Infection with HIV-2. **AIDS**, v. 15, n. Suppl 5, p. 25-45, 2001.

BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS**, v. 1, p. 1–100, 2015.

BRASIL; MINISTERIO DA SAÚDE. **Nota Técnica nº 177/2015**. Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/legislacao/2016/58712>>. Acesso em: 30 maio. 2017.

BROUTET, N. et al. Prevalence of HIV-1, HIV-2 and HTLV antibody in Fortaleza, Ceara, Brazil, 1993-1994. **International Journal of STD & AIDS**, v. 7, n. 5, 1996.

CAMPBELL-YESUFU, O. T.; GANDHI, R. T. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 6, p. 780–787, 2011.

CARVALHO, A. C. et al. Population mobility and the changing epidemics of HIV-2 in Portugal. **HIV Medicine**, v. 13, n. 4, p. 219–225, 2012.

CARVALHO, M. B. et al. Risk Factor Analysis and Serological Diagnosis of HIV-1/2 Infection in a Brazilian Blood Donor Population: validation of the World Health Organization Strategy for HIV Testing. **AIDS**, p. 1135–1140, 1996.

CAZEIN, F. .; HAMERS, F. .; ALIX, J. . **Prevalence of hiv-2 infection in europe**. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=196>>. Acesso em: 11 out. 2016.

CHEN, Z.; TELFIER, P.; GETTIE, A.; REED, P.; ZHANG, L.; HO, D. D.; MARX, P. A. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: Geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey tr. **Journal of virology**, v. 70, n. 3617–3627, 1996.

CORTES, E. . et al. HIV-1, HIV-2, and HTLV-1 infection in high-risk groups in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 15, p. 935–958, 1989.

DE SILVA, T. I.; COTTEN, M.; ROWLAND-JONES, S. L. HIV-2: the forgotten AIDS virus. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 588–595, 2008.

DOUGAN, S. et al. Diagnoses of HIV-1 and HIV-2 in England, Wales, and Northern Ireland associated with west Africa. **Sexually transmitted infections**, v. 81, n. 4, p. 338–341, 2005.

DUVALL, M. G. et al. Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 6973–6981, 2006.

ESBJÖRNSSO, J. et al. Increased survival among HIV-1 and HIV-2 dual-infected individuals compared to HIV-1 single-infected individuals. **AIDS (London, England)**, v. 28, n. 7, p. 949–957, 2014.

ESBJÖRNSSON, J. et al. Inhibition of HIV-1 Disease Progression by Contemporaneous HIV-2 Infection. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 3, p. 224–232, 2012.

FERREIRA-JUNIOR, O. DA C. et al. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. Disponível em:

<[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55594/manual\\_tecnico\\_hiv\\_2016\\_final\\_25\\_07\\_pdf\\_54115.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55594/manual_tecnico_hiv_2016_final_25_07_pdf_54115.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2016.

FUSUMA, E. E. et al. Duplication of peri-kappa B and NF-kappa B sites of the first human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) transmission in Brazil. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 21, n. 11, p. 965–970, 2005.

GAO, F.; YUE, L.; WHITE, A. T.; PAPPAS, P. G.; BARCHUE. J.; HANSON, A. P.; GREENE, B. M.; SHARP, P. M.; SHAW, G. M.; HAHN, B. H. Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in west Africa. **Nature**, v. 358, n. 495–499, 1992.

GRANATO, C. et al. Occurrence of HIV-1 and HIV-2 in Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 5, n. 5, p. 531–533, 1992.

HENDRY, R. M. . et al. Lack of evidence for HIV-2 infection among at-risk individuals in Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 4, n. 6, p. 623–627, 1991.

HIRSCH, V. M. et al. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature**, v. 339, p. 389–392, 1989.

HOFFMANN, C. J. .; GALLANT, J. E. HIV e SIDA. **ACP Medicine**, p. 1–33, 2007.

KANKI, P. J.; ROWLAND-JONES, S. The protective effect of HIV-2 infection. **AIDS**, v. 28, n. 7, p. 1065–1067, 2014.

KASHYAP, B.; GAUTAM, H.; BHALLA, P. Epidemiology and seroprevalence of human immunodeficiency virus type 2. **Intervirology**, v. 54, n. 3, p. 151–155, 2011.

LEAN, P. S. et al. Introduction of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection in the Philippines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 516–518, 2003.

LELIGDOWICZ, A. et al. Direct relationship between virus load and systemic immune activation in HIV-2 infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 1, p. 114–122, 2010.

LEMEY, P. et al. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6588–6592, 2003.

MACHUCA, A. et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection in Spain. **Intervirology**, v. 42, n. 1, p. 37–42, 1999.

MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5178, p. 1587–1590, 1994.

MATHERON, S. et al. Vertical transmission of HIV-2. **The Lancet**, v. 335, n. 8697, p. 1103–1104, 1990.

MATHERON, S. et al. Factors associated with clinical progression in HIV-2 infected-patients: the French ANRS cohort. **AIDS (London, England)**, v. 17, n. 18, p. 2593–2601, 2003.

MAUEIA, C. et al. Frequency of human immunodeficiency virus type-2 in hiv infected patients in Maputo City, Mozambique. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 408, 2011.

MEDINA, C. et al. Differential effects of sex in a West African cohort of HIV - 1 , HIV - 2 and HIV - 1 / 2 dually infected patients: men are worse off. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 2, p. 253–262, 2016.

NAM, J.-G. et al. Molecular investigation of human immunodeficiency virus type 2 subtype a cases in South Korea. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1543–1546, 2006.

NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH, A. I. **Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2)**. Disponível em:

<<http://www.hivguidelines.org/clinical-guidelines/adults/human-immunodeficiency-virus-type-2-hiv-2/>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

O'DONOVAN, D. et al. Maternal plasma viral RNA levels determine marked differences in mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in The Gambia. **AIDS**, v. 14, n. June 1999, p. 441–448, 2000.

PIENIAZEK, D. . et al. Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. **AIDS**, v. 5, p. 1293–1299, 1991.

PRINCE, P. D. et al. Mortality rates in people dually infected with HIV-1/2 and those infected with either HIV-1 or HIV-2: a systematic review and meta-analysis. **AIDS (London, England)**, v. 28, n. 4, p. 549–558, 2014.

ROMIEU, I. et al. HIV-2 link to AIDS in West Africa. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 3, n. 3, p. 220–230, 1990.

RUELLE, J. et al. Transmitted drug resistance, selection of resistance mutations and moderate antiretroviral efficacy in HIV-2: analysis of the HIV-2 Belgium and Luxembourg database. **BMC infectious diseases**, v. 8, p. 21, 2008.

SANKALÉ, J. L. . et al. Genetic characterization of viral quasispecies in blood and cervical secretions of HIV-1- and HIV-2-infected women. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 14, n. 16, p. 1473–1481, 1998.

SANTIAGO, M. L.; RANGE, F.; KEELE, B. F.; LI, Y.; BAILES, E.; BIBOLLET- RUCHE, F.; FRUTEAU, C.; NOE, R.; PEETERS, M.; BROOKFIELD, J. F. . et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: Implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12515–12527, 2005.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 2011.

SIGNORINI, D. J. H. P. **Elaboração de um modelo de entrada de dados em HIV/AIDS visando efetuar estudos clínicos e epidemiológicos de pesquisa e uma análise de sobrevivência dos pacientes com AIDS atendidos em um Hospital Universitário na cidade do Rio de Janeiro, 1995-2002**. 2004. 120p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

SMITH, S. M. et al. Isolation of a new HIV-2 group in the US. **Retrovirology**, v. 5, p. 103, 2008.

SORIANO, V. et al. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: Clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. **Journal of Medical Virology**, v. 61, n. 1, p. 111–116, 2000.

SOUSA, A. E. et al. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 3400–3406, 2002.

TORIAN, L. V. et al. **HIV-2 Infection Surveillance— United States, 1987-2009**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6029a3.htm>>. Acesso em: 4 out. 2016.

TORIAN, L. V et al. HIV type 2 in New York City, 2000-2008. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 11, p. 1334–1342, 2010.

TORO, C.; SORIANO, V.; GRUPO ESPAÑOL PARA EL ESTUDIO DEL VIH-2 Y HTLV. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 y virus linfotrópicos humanos tipos 1 y 2 en España. **Med Clin (Barc)**, v. 129, n. 1, p. 14–16, 2007.

TRIVERS, K. et al. Natural protection against HIV-1 infection provided by HIV-2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, p. 1612–1615, 1995.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Diagnóstico de HIV**. Disponível em: <<http://telelab.aids.gov.br/>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

VAN DER LOEFF, M. et al. Undetectable plasma viral load predicts normal survival in HIV-2-infected people in a West African village. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 46, 2010.

VERONESI, R. et al. HIV-2 IN BRAZIL. **The Lancet**, v. 330, n. 8555, p. 402, 1987.

VICENTE, A. C. P.; MOMEN, H. Surveillance Using Molecular Tools: Examples from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 703–704, 1998.

WALDMAN, E. A.; ROSA, T. E. DA C. **Vigilância em Saúde Pública**. v. 3 ed. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV/AIDS**. Disponível em:

<<http://www.who.int/gho/hiv>>. Acesso em: 20 jun. 2011.