

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL

PROFESSOR FERNANDO FIGUEIRA

PROGRAMA DE MESTRADO EM SAÚDE MATERNO INFANTIL

**FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS A RESISTÊNCIA
AOS ANTIRRETROVIRAIS E VARIABILIDADE GENÉTICA DO
HIV EM GESTANTES RECENTEMENTE DIAGNOSTICADAS
PARA O HIV EM LUANDA-ANGOLA**

EMINGARDA PATRÍCIA ANDRÉ FÉLIX CASTELBRANCO

RECIFE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EMINGARDA PATRÍCIA ANDRÉ FÉLIX CASTELBRANCO

FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS A RESISTÊNCIA AOS
ANTIRRETROVIRAIS E VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV EM
GESTANTES RECENTEMENTE DIAGNOSTICADAS PARA O HIV
EM LUANDA-ANGOLA

Dissertação apresentada à Pós-graduação *stricto-sensu*
do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando
Figueira como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Saúde Materno Infantil.

Linha de Pesquisa: DST-AIDS

Orientador: Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar

Co-Orientador: Dr. Edvaldo da Silva Souza

RECIFE 2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Biblioteca Ana Bove do IMIP

C35p Castelbranco, Emingarda Patricia André Félix

Prevalência de mutações associadas a resistência em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV em Luanda – Angola / Emingarda Patrícia André Félix Castelbranco – Recife: E. P. A. F. Castelbranco, 2009.

64 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Materno Infantil) – Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP.

Linha de pesquisa: DST-AIDS.

Orientador: Luiz Cláudio Arraes de Alencar, co-orientador: Edvaldo da Silva Souza.

1. HIV. 2. Agentes anti-HIV. 3. Gravidez. I. Alencar, Luiz Claudio Arraes de. II. Souza, Edvaldo da Silva. III. Título.

NLM W4

Linha de Pesquisa: DST-AIDS

Mestranda: Emingarda Patrícia André Félix Castelbranco

Bióloga Molecular do Instituto Nacional de Saúde Pública em Luanda-Angola.

Telefones: (81) 99832405, +244 923619841

Email: emingardacastelbranco@hotmail.com

Orientador: Luiz Cláudio Arraes de Alencar

Médico Infectologista do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

Endereço Profissional: Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista

Recife – PE – Brasil CEP 50.070-550

Telefones: (81) 2101-2564, (81) 9961-2220

Email: lularraes@imip.org.br

Co-orientador: Edvaldo da Silva Souza

Médico Pediatra do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

Endereço Profissional: Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista.

Recife – PE – Brasil CEP 50.070-550

Telefone: (81) 9975-8035

Email: essouza@terra.com.br

RECIFE 2009

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROFESSOR FERNANDO FIGUEIRA

MESTRADO EM SAÚDE MATERNO INFANTIL

**FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS
ANTIRRETROVIRAIS E VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV EM
GESTANTES RECENTEMENTE DIAGNOSTICADAS PARA O HIV EM
LUANDA-ANGOLA**

Artigo: Frequência de resistência primária aos antirretrovirais e variabilidade genética do HIV em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV-1 em Luanda-Angola

RECIFE 2009

EMINGARDA PATRÍCIA ANDRÉ FÉLIX CASTELBRANCO

FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS
ANTIRRETROVIRAIS E VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV EM GESTANTES
RECENTEMENTE DIAGNOSTICADAS PARA O HIV EM LUANDA-ANGOLA

Dissertação submetida ao corpo docente do Mestrado em Saúde Materno Infantil do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, defendida perante a banca examinadora em 9 de outubro de 2009.

Orientador: _____

Luiz Cláudio Arraes de Alencar

Examinadores: _____

Dr. Jailson de Barros Correia

Dr. Aurélio Costa

Dr^a Heloísa Ramos Lacerda

RECIFE 2009

À Deus pelo dom da Vida.

Aos meus pais Marcela e José pelos valores e educação.

Ao meu esposo, amigo e companheiro Nuno Castelbranco.

E a minha filha Eduarda Castelbranco

Eterna Gratidão!

"Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos,
bati na porta da vida e disse-lhe: não tenho medo de
vivê-la!"

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer à **Deus** por me permitir acordar a cada novo dia de muitas bênçãos; pelo pleno funcionamento do meu corpo físico, mental, espiritual e emocional; pelos meus talentos, capacidades e serenidade. Obrigada Senhor!

Às **gestantes** que aceitaram participar deste trabalho científico.

Ao **Governo da República de Angola, Direcção do Ministério da Saúde de Angola**, pelo apoio incondicional, sem o qual esse trabalho de investigação científica não seria possível.

Ao meu orientador **Lula Arraes**, pelos ensinamentos e dedicação neste trabalho.

Ao meu co-orientador, **Edvaldo Souza** por estar sempre presente no passo a passo do trabalho.

À **Dr^a Terezinha Tabosa**, Diretora do Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) , sempre muito atenciosa e disposta para ajudar no que fosse preciso.

Às funcionárias do LACEN-PE do Laboratório de Virologia, **Ana Salustiano e Shirley Pereira** que muito me apoiaram nos dias de angústias em que as amostras não funcionavam, elas sempre me incentivaram a ter muita calma e perseverança para o final desse trabalho.

À **pós-graduação do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira**, pela eficiência e contribuição para que os objetivos do mestrado fossem alcançados e aos **meus colegas de turma** que me fizeram desfrutar de momentos agradáveis e divertidos no decorrer desses 18 meses de convivência.

Aos **funcionários das Maternidades Lucrecia Paim e Augusto N'Gangula** que participaram deste estudo em especial a **Enfª Paula e Conceição** que incansavelmente se dedicaram neste estudo.

Aos **funcionários do Instituto Nacional de Luta Contra a Sida e Instituto Nacional de Saúde Pública, Drª Ducleina Serrano e Drª Filomena Gomes da Silva**, respectivamente que deram o seu contributo.

Aos **meus colegas do INSP, Jocelyne de Vasconcelos e Domingo Ebo**, por acreditarem e me fizeram crer que sou capaz.

À **Drª Elisa Pedro Gaspar**, pelo grande incentivo, força e carinho que ela sempre me deu.

À **toda minha família, Família Candengue, Família Félix Sobrinho e Família Castelbranco**, não existem palavras para expressar o que vocês significam pra mim.

A **minha prima Lucélia**, pelo companheirismo ao longo desses dois anos.

Aos **meus pais José e Marcela Sobrinho**, seus valores, atenção, carinho e amor que sempre me dedicaram e que tem enriquecido a minha vida de todas as maneiras.

Meu esposo, Nuno Castelbranco, o anjo que Deus colocou em minha vida pela perseverança, companheirismo, apoio incansável e amor incondicional e **minha filha Eduarda Castelbranco**, por entender que precisei estar ausente algumas vezes.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

Obrigada de todo coração!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

I. APRESENTAÇÃO	15
II. OBJETIVOS	18
III. MÉTODOS.....	19
IV. RESULTADOS.....	31
ARTIGO.....	32
V.CONCLUSÃO	55
VI. REFERÊNCIAS.....	56
VII. APÊNDICES	57
APÊNDICE 1	57
APÊNDICE 2	62
VIII. ANEXOS.....	64
ANEXO 1	64
ANEXO 2.....	65
ANEXO 3.....	66

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ART	Terapia Antirretroviral
AZT	Zidovudina
CD4	Glicoproteína de superfície das células T.
CDC	Centro para o Controle e Prevenção de Doenças
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CRF	Circulating Recombinant Forms
D4T	Stavudina
ddATP	Dideoxiadenosina trifosfato
ddCTP	Dideoxicitidina trifosfato
ddGTP	Dideoxiguanosina trifosfato
ddTTP	Dideoxitimina trifosfato
DDI	Didanosine
ddNTPs	Dideoxynucleotídeo trifosfato
ddTTP	Dideoximidina
DLV	Delavirdine
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFV	Efavirenz
ETR	Etravirine
FTC	Emtricitabina
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy

HIV	Human Immunodeficiency Virus
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
INLS	Instituto Nacional de Luta Contra a Sida
INSP	Instituto Nacional de Saúde Pública
IP	Inibidores da Protease
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reverse Não-Análogos de Nucleosídeos
LACEN-PE	Laboratório Central de Pernambuco
ml	Mililitro
MTCT	Mother to Child Transmission
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Polimerase Chain Reaction
POL	Gene que codifica a enzima que participa na replicação viral
PTV	Programa da Transmissão Vertical
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transcriptase
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SSA	Sub-Saharan Africa
TDF	Tenofovir
UNAIDS	United Nation Programme on HIV/AIDS
URF	Unique Recombinant Forms

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das gestantes soropositivas para HIV-1 de acordo com as características biológicas e achados clínicos e laboratoriais-----	50
Tabela2. Distribuição dos subtipos identificados em 36 amostras de acordo com o Stanford University HIV-1 Drug Resistance Database-----	51

RESUMO

Cenário: a determinação da prevalência de resistência primária aos antirretrovirais em diferentes localidades do mundo é de extrema importância no monitoramento da epidemiologia molecular do HIV, podendo orientar a terapêutica inicial dos pacientes em determinada área geográfica. **Objetivos:** determinar a frequência de resistência primária aos antirretrovirais e descrever a variabilidade genética do HIV-1 em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV nas Maternidades Lucrecia Paim e Augusto N'gangula em Luanda-Angola. **Métodos:** amostras biológicas de 57 gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV inseridas no PTV, provenientes de Luanda-Angola foram coletadas entre novembro de 2008 a janeiro de 2009 foram testadas quanto à carga viral, TCD4+. A caracterização molecular do HIV foi feita pelo sistema de Sequenciamento OpenGene DNA da região *pol* do genoma HIV-1_{LAV-1}. **Resultados:** 36 (63,2 %) das 57 amostras foram seqüenciadas, foi detectada uma (2,8 %) mutação associada à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e duas (5,6 %) mutações associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos. Mutações primárias associadas aos ITRNN e ITRN foram detectadas em duas (5,6 %) gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV-1. Não foram encontradas mutações associadas aos inibidores da protease. Os subtipos F1, C, CRF02_AG, D, A1, G, H e J foram detectados. **Conclusão:** a presença de resistência primária nessa população de gestantes virgens de tratamento foi baixa, porém com alta variabilidade genética.

Palavras-chaves: Infecção do HIV, resistência viral, droga antirretroviral, gestação.

ABSTRACT

Background: the determination of the prevalence of primary resistance to antiretroviral therapy in different places in the world is of extreme importance in molecular epidemiology monitoring and it can guide the initial patient therapy in a given geographical area. **Objectives:** to determine the frequency of primary resistance to antiretroviral and describe the genetic variability of HIV-1 in newly diagnosed HIV infected pregnant women in maternities Lucrecia Paim e Augusto N'Gangula in Luanda-Angola. **Methods:** biological samples of 57 pregnant women recently diagnose HIV positive participating in the MCTC program from Luanda-Angola were collected between November 2008 and January 2009 and were tested for viral load quantification and TCD4+. Molecular characterization of HIV was performed by OpenGene DNA sequencing system of genome HIV-1_{LAV-1} in the *pol* region. **Results:** 36 (63.2%) out of 57 samples were sequenced, one (2,8%) mutation associated with resistance nucleoside reverse transcriptase inhibitors was detected and two (5.6%) mutations associated with resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors were also detected. Primary mutations associated with ITRNN and ITRN were detected in two (5.6%) pregnant newly diagnosed HIV-1 infected women. None of the primary mutations associated with protease inhibitors was found. Subtypes A1, C, D, CRF02_AG, F1, G, H and J were detected. **Conclusion:** the presence of primary resistance in this treatment-naive pregnant population was low, but the genetic variability in Angola was very high.

Keywords: HIV infection, viral resistance, antirretroviral drugs, pregnancy.

I. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi elaborada no formato de um artigo e aborda a temática da análise genotípica e perfil mutacional de resistência do (Vírus da Imunodeficiência Humana) HIV às drogas antirretrovirais em Angola.

Em 2007 foi realizado um estudo de soroprevalência da infecção pelo HIV em gestantes angolanas encontrando-se uma prevalência de 2,1% de mulheres infectadas. O uso universal das drogas antirretrovirais em Angola teve início em 2004 e até o momento mais de 11.240 pessoas fazem o uso desses medicamentos.

Com o uso das drogas antirretrovirais observou-se um aumento na sobrevivência das pessoas infectadas pelo HIV, porém vários fatores podem levar ao desenvolvimento de resistência às drogas antirretrovirais.

Assumindo que gestantes atendem consulta pré-natal, implica assim, fácil acesso a população sexualmente ativa, e visto que a resistência às drogas da terapia antirretroviral está fortemente associada à falha do tratamento, o que exige resgate terapêutico, deste modo aumenta a probabilidade de pessoas recém-infectadas adquirir um vírus com mutações de resistência. Nessa altura, o teste de genotipagem pode ser o instrumento útil na selecção das drogas do novo esquema, ele pode ajudar a prolongar a vida do tratamento e, conseqüentemente, a das pessoas vivendo com HIV, em especial as grávidas e a eficácia dos esquemas de drogas preconizados para a prevenção da transmissão vertical pode ficar limitada de acordo com a resistência primária nesta população.

O trabalho de campo foi realizado de novembro de 2008 a janeiro de 2009 em Luanda, capital de Angola, nas Maternidades Lucrecia Paim e Augusto N'Gangula.

Essa pesquisa foi coordenada por Emingarda Castelbranco, funcionária do Ministério da Saúde de Angola, alocada no Instituto Nacional de Saúde Pública (INSP) que é o laboratório de referência para o país. O INSP foi o local de realização da contagem de linfócitos T CD4+ e o Instituto Nacional de Luta contra a Sida (INLS) sediou a realização da quantificação da carga viral do HIV, enquanto que a genotipagem ficou a cargo do Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) em Recife na República Federativa do Brasil.

Ao término da fase de coleta, a pesquisadora começou a tabular os resultados da pesquisa. A pesquisadora participou em todas as fases da realização da pesquisa, desde a adaptação do questionário à realidade angolana, até a análise dos dados resultantes do trabalho de campo.

Tendo participado da coleta dos dados na condição de entrevistadora e supervisora do trabalho de campo, e da análise dos dados, sabendo da importância da execução desta pesquisa em Angola, onde teve a oportunidade de desenvolvimento instrumental e trazer ao público informações capazes de avaliar a resistência primária, a pesquisadora resolveu juntamente com os seus orientadores, classificar a resistência às drogas antirretrovirais em gestantes recentemente diagnosticadas pelo HIV em Luanda de Novembro de 2008 à Janeiro de 2009.

O artigo trata de relatar a frequência de mutações associadas a resistência primária às drogas antirretrovirais em gestantes e descreve a variabilidade genética do HIV em Luanda.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a frequência da resistência primária às drogas antirretrovirais em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV em Luanda–Angola.

2.2. Objetivos Específicos:

Em mulheres grávidas portadoras de HIV-1 vinculadas ao PTV nas Maternidades Augusto N'gangula e Lucrecia Paim em Luanda descrever:

1. A característica biológica (idade) e a característica obstétrica (idade gestacional no momento do recrutamento).
2. Os achados laboratoriais (Contagem dos linfócitos T CD4+ e quantificação da carga viral).
3. O grupo e subtipo do HIV-1.
4. As mutações e determinar a taxa de resistência primária às drogas antirretrovirais.

III. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo: realizou-se um estudo de corte transversal em contexto hospitalar.

3.2. Local do estudo:

O estudo foi realizado nas Maternidades Augusto N'gangula e Lucrecia Paim que estão localizadas na cidade de Luanda, capital de Angola. Luanda é a menor província de Angola, com 2.418 km² de área. Angola tem uma população aproximada de 17.000.000 habitantes sendo 49,3% homens e 50,7% mulheres. Sua capital é Luanda, com mais de 5.000.000 de habitantes, com idade média de 19 anos. Angola possui a maior taxa de fecundidade e de mortalidade infantil do mundo. Apesar da riqueza do país, a sua população vive em condições de extrema pobreza, com menos de dois dólares americanos por dia. A população de Angola é constituída por 90% de indivíduos de raça negra, e por 10% de raça branca e mestiça ¹.

A Maternidade Augusto N'gangula foi inaugurada nos meados dos anos 60 e atende em média 56 partos por dia. Destina-se ao atendimento de consultas, partos e gestantes de risco, internamentos de pediatria, ginecologia e obstetrícia. Conta com 41 médicos, dos quais 11 especialistas e 483 enfermeiros.

A Maternidade Lucrecia Paim, por ser a maternidade central, recebe uma população de todas as províncias do país. A Maternidade Lucrecia Paim conta atualmente com 400 leitos, serviços de telemedicina, imunoterapia e realiza o diagnóstico pré-natal de malformação congênita. No ano de 2007 realizou 21.035 partos.

O Programa da Transmissão Vertical (PTV) teve início na Maternidade Augusto N´Gangula, em 2004 e Maternidade Lucrecia Paim, em 2006, Em 2007 mais de 1662 grávidas soropositivas para o HIV-1 aderiram ao Programa.

3.3. Período do estudo

A coleta de dados foi realizada de Novembro de 2008 á Janeiro de 2009.

3.4. População do estudo

Mulheres em consulta pré-natal com teste HIV positivo sem tratamento prévio com antirretrovirais.

3.5. Amostra

Foi realizada uma amostragem não probabilística tipo amostra de conveniência, com mulheres incluídas no PTV no período do estudo.

3.5.1. Tamanho amostral

De acordo com o Myatt: M. e Bennett D.², a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza ≤ 50 amostras para estudos epidemiológicos que tratam de detectar a frequência de resistência primária em países de recursos limitados, e para o estudo foram coletadas 57 amostras.

3.6. Critérios de elegibilidade

3.6.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídas todas as gestantes com idade materna acima dos 18 anos, que compareceram em uma ou na outra maternidade em consulta pré-natal e que tiveram teste positivo para o HIV e desse modo participaram do PTV.

3.6.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo todas as gestantes que já tivessem feito o uso prévio da terapia antirretroviral, e diagnóstico de infecção pelo HIV antes da gestação.

3.6.3. Procedimentos para a seleção das participantes

As pacientes que fizeram parte do estudo foram aquelas que compareceram em uma das duas maternidades encaminhadas para o PTV por terem sido diagnosticadas para o HIV-1. Uma vez identificadas e preenchendo os critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo. Após explicação dos objetivos do estudo, aquelas que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1).

O fluxograma de captação e acompanhamento das participantes é apresentado na Figura 1.

3.7. Definição dos termos e operacionalização de variáveis

- **Teste HIV +:** foi definido como o exame que apresentou evidência laboratorial de infecção pelo HIV, ou seja, dois testes anti-HIV serem positivos de acordo com o algoritmo de Angola.
- **Diagnóstico recente:** foi definido como a realização do teste anti-HIV no dia da entrevista e este ser positivo, dois testes rápidos.
- **Resistência Primária:** foi definida como sendo a resistência aos antirretrovirais detectadas em pacientes sem uso prévio de drogas antirretrovirais, é uma variável categórica dicotômica.
- **Idade:** variável numérica contínua, expressa em anos completos, determinada de acordo com a informação da paciente no dia da entrevista.
- **Idade gestacional:** variável numérica contínua expressa em semanas de gestação calculada pela data da última menstruação e/ou confirmada por ultra-sonografia precoce.
- **Contagem de Linfócitos T CD4+:** variável numérica contínua, que foi expressa em número de linfócitos/ mm³ de sangue.
- **Carga Viral:** variável numérica contínua, que foi expressa em cópias de RNA/ml de sangue.
- **Grupo e Subtipos do HIV-1:** variável categórica policotômica, são conhecidos 4 grupos para o HIV-1, grupo M, O, N e P. Mais de 90% das infecções por HIV-1 pertencem ao grupo M, que está subdividido em 9 subtipos A-D, F-H, J e K e algumas formas recombinantes circulantes que são as CRFs.
- **Mutações primárias:** são mutações simples que conferem resistência às drogas antirretrovirais

- **Mutações secundárias:** são mutações que conferem resistência parcial aos antirretrovirais.

3.7.1. Descrição dos procedimentos, testes e técnicas

Foram coletados 9 ml de sangue em todas as gestantes elegíveis e os mesmos foram distribuídos em três tubos padronizados de 5 ml, contendo 0,5 ml de anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) devidamente identificados com as iniciais da voluntária e o número do protocolo. Imediatamente após a coleta das amostras do dia, a pesquisadora responsável pela coleta transportou os tubos em caixa térmica com blocos de gelo ao Laboratório Nacional de Saúde Pública (LNSP) para o manejo adequado das amostras.

O primeiro tubo foi feito a contagem dos linfócitos T CD4+ antes de 24 horas de coleta, no LNSP. O segundo tubo foi encaminhado para o INLS para ser feita a quantificação da carga viral e o terceiro tubo, foi feita separação do plasma do sangue total usando uma centrífuga refrigeradora, a uma rotação de 1.500rpm por 10 minutos. Em seguida foram retiradas duas alíquotas de plasma para micro tubos estéreis, livres de RNase e DNase com tampa de rosca, próprios para o congelamento e armazenados a uma temperatura de -70°C, que foram enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco em Recife na República Federativa do Brasil de avião em caixa térmica com gelo seco, para assim ser processado o teste de genotipagem.

➤ **Contagem de linfócitos CD4+**

A contagem de linfócitos CD4+ foi processada no LNSP em Luanda-Angola. Foi feita em todas as amostras usando o aparelho FacsCount; (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J) ³ equipamento modular de citometria de fluxo da *Becton Dickinson*

Immunocytometry Systems (BDIS) desenvolvido para rotina clínica e pesquisa avançada. É o sistema mais completo atualmente para a determinação automatizada de Linfócitos-T CD4, CD8 e CD3, parâmetros de grande utilidade para a monitorização do estado imune de pacientes infectados com o vírus HIV, responsável pela Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

➤ **Quantificação da Carga Viral**

A quantificação da carga viral foi processada no Instituto Nacional de Luta Contra a Sida (INLS) usando a tecnologia de Amplificação Baseada na Sequência de Ácidos Nucléicos (NASBA)⁴ O sistema *Nuclisens HIV QT* foi desenvolvido baseado na tecnologia NASBA, imitando *in vitro* o ciclo replicativo do HIV-1 *in vivo*. É um sistema completo de alta confiabilidade e sensibilidade capaz de detectar em uma única reação um valor de carga viral variável em uma faixa de 40 à 10.000.000 de cópias na amostra testada.

➤ **Genotipagem do HIV-1**

A genotipagem do HIV-1 foi realizada no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) no Brasil, com equipamentos automatizados chamados sequenciadores que determinam a sequência de bases nitrogenadas presentes nos genes do HIV que codificam duas proteínas, as enzimas transcriptase e a polimerase sendo responsáveis pela capacidade de transcriptase reversa, de multiplicação do vírus e alvo de um dos grupos de drogas antirretrovirais, os inibidores da transcriptase. O outro grupo de drogas, os inibidores da protease, age sobre a fase de maturação e eliminação de virions a partir da célula infectada, neutralizando a enzima protease.

Foi usado o TRUGENE HIV-1 GENOTYPING KIT ⁵ que é o sistema para Sequenciamento OpenGene DNA que tem a finalidade para detecção das mutações genômicas do HIV (na protease e parte das regiões da transcriptase reversa) a qual

confere resistência aos tipos específicos de drogas antirretrovirais. Essas duas regiões codificam os principais alvos para o tratamento da droga antirretroviral. O desenvolvimento da resistência viral a estas drogas está associado com as mutações dentro destas regiões codificadoras. As mutações são identificadas sequenciando um produto RT-PCR correspondentes a estas regiões, e complemento ao controle terapêutico do paciente portador de HIV-1, infecção subtipo B e uma carga viral mínima de 1000 cópias de RNA por ml.

O TRUGENE HIV-1 GENOTYPING KIT consiste em alguns processos.

◆ **Extração do DNA**

O DNA genômico foi extraído a partir de 140µl de plasma usando o QIAamp Viral DNA purification KIT-QIAGEN⁶ (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, esta técnica representa uma tecnologia de propósito geral bem estabelecida para a preparação do RNA viral. O kit combina com propriedades de ligação seletiva de membrana baseado em gel de sílica com a velocidade de microspin e é ideal para processos simultâneos de várias amostras. A amostra é primeiro lisada sob condições altamente desnaturante para desativar os RNases e para garantir o isolamento de RNA viral intacta. Condições de tampão são ajustadas para promover uma boa ligação do RNA à membrana QIAamp, e a amostra é carregada na coluna QIAamp Mini spin. O RNA liga-se a membrana, e os contaminantes são lavados eficientemente em dois passos usando dois tampões de lavagens diferentes. RNA de alta qualidade é elucionado num tampão especial livre de RNase, preparado para uso direto e conservação segura. O RNA purificado é livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes de inibidores. A membrana especial QIAamp garante recuperação

extremamente elevada de pura RNA intacta em 20 minutos sem o uso de extração de fenol/cloroformo ou precipitação de álcool. Todos os tampões e reagentes são garantidos por serem livres de RNase.

◆ **Transcrição Reversa e Amplificação PCR (RT-PCR)**

O TRUGENE HIV-1 GENOTYPING KIT amplifica uma sequência discreta da transcriptase reversa e gene da protease. Os genes HIV-1 *pol* são nucleotídeos 297 e 1,680 no comprimento das regiões da protease e transcriptase reversas respectivamente e estão localizados nas posições 1835-4678 (incluindo a região *RNase H*) na região *pol* do genoma HIV-1_{LAV-1} (GenBank nº K02013). Devido a natureza altamente polimórfica do HIV-1, uma mistura de vários primers especificados como as variantes virais mais comuns são utilizadas neste kit.

As amostras de RNA extraídas foram adicionadas nos tubos de reação em que ocorreu a amplificação PCR e a transcrição reversa. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando uma versão de engenharia genética da transcriptase reversa do Vírus Leucemia Murino Moloney para transcrever o HIV-1 RNA no cDNA.

A mistura reacional foi então aquecida e a seguir esfriada a uma temperatura específica para permitir que os primers oligonucleotídeos se anelassem especificamente no RNA HIV-1 alvo. Na presença de um excesso de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima RT ampliou os primers anelados formando um DNA:RNA complementar híbrido (cDNA:RNA).

◆ **Reação de sequenciamento (CLIP)**

A reação CLIP do DNA sequencia simultaneamente as duas cadeias da hélice dupla de DNA. Um tubo de ensaio foi preparado contendo oito primers. Os primers posterior (sense) e reverso (antisense) foram marcados com um fluorescente diferente. Quando hibridizados ao DNA, os primers foram orientados a permitir uma extensão da

cadeia entre eles (um primer na cadeia sense e outro na cadeia antisense). O tubo também tinha os reagentes necessários para a extensão da cadeia junto com um dos quatros trifosfatos dideoxynucleotídeo terminais da cadeia (ddNTPs); dideoxiadenosina trifosfato (ddATP), dideoxiguanosina (ddGTP) ou dideoicitimidina (ddCTP) ou dideoxitimidina (ddTTP). A reação iniciou com a adição da amostra e uma DNA polimerase termoestável com uma alta afinidade por ddNTPs. À medida que a mistura reacional foi cíclica termicamente, os primers se hibridizavam ao “template” DNA e foram estendidas, terminadas em geral em algum local ao longo da sequência DNA alvo. Quatro reações CLIP resultaram na sequência posterior e reversa do alvo entre os dois primers CLIP. A reação continuava durante os 30 ciclos gerando altos níveis de produtos de reação terminada de cadeia de cada primer. Até programa de ciclagem estar completo foi adicionado o reagente Solução STOP em todos os tudo de ensaio.

◆ **Eletroforese dos Produtos de reação CLIP**

Após a reação de sequenciamento CLIP e a adição da Solução STOP, as reações foram aquecidas para separar os fragmentos de DNA de cadeia dupla. Uma fração a cada reação foi então carregada na parte superior de um cartucho MicroCel 500 que contém o gel de poliacrilamida polimerizado vertical ultra fino que é a sua matriz com uma dimensão de poro especificada. O gel de poliacrilamida contém uma alta concentração de uréia para manter os fragmentos de DNA no estado desnaturado de cadeia simples. Uma solução tampão manteve o contato tanto com a parte superior como com a base de gel ultrafino. Um campo elétrico de alta voltagem foi aplicado, forçando os fragmentos de DNA negativamente carregados a migrarem através do gel em direção do ânodo. A velocidade de migração dos fragmentos de DNA está relacionada com a dimensão dos poros formados pela matriz de poliacrilamida e dimensão dos fragmentos DNA, com a migração mais rápida dos fragmentos menores.

Próximo à base do gel de poliacrilamida, um raio laser excita o corante fluorescente ligado aos fragmentos DNA que se movem pelo laser e os detectores medem o total de luz e comprimentos de onda produzidos pelo corante fluorescente. Estas medições de luz são coletadas pelo seqüenciador e transmitidas para a estação de trabalho que grava os dados. Cada reação de seqüenciamento necessita de quatro partes para cada um dos quatros dideoxynucleotídeos terminais (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

Para cada “template”, duas regiões do amplicon (protease e RT) foram sequenciadas bidirecional utilizando quatro módulos primer CLIP.

Protease: Uma sequência bidirecional da região da protease (códon 10 a 99) e uma sequência em pelo menos uma direção a partir dos códon 1 a 9.

P2: Uma sequência bidirecional da região protease (códon 21 a 99) e uma sequência em pelo menos uma direção a partir dos códon 7 a 20.

RT Inicial: Uma sequência bidirecional do início da região transcriptase reversa (códon 41 a 139) e uma sequência em pelo menos uma direção a partir dos códon 140 a 142 e códon 40.

RT Mediano: Uma sequência bidirecional da metade da região da transcriptase reversa (códon 148 a 237) e uma sequência em pelo menos uma direção a partir dos códon 138 a 147 e a partir dos códon 238 a 247.

◆ Genotipagem-Análise dos dados

Os dados posteriores e reversos da sequência CLIP foram combinados e comparados à sequência do HIV-1_{LAV-1} com o software do sistema para determinar a presença de todas as mutações, incluindo as mutações resistentes às drogas. Foi analisada toda sequência do genoma para revisar inserções e eliminações. Todas as bases em cada um dos códon conhecidas por serem associadas com resistência foram selecionadas pelo software e estes sítios foram revisados pela pesquisadora. O software

prepara um relatório que é baseado em um conjunto de critérios definidos, desenvolvido por um painel clínico internacional e pesquisadores especializados, sendo implementado no GuideLines Rules usado no software do sistema.

3.8. Coleta de dados

3.8.1 Instrumento para coleta dos dados

Os dados foram coletados utilizando-se um formulário padrão, pré-codificado para entrada de dados em computador (Apêndice 2).

3.8.2. Processamento e análise dos dados

Os dados foram digitados em banco de dados específicos criado no programa estatístico de domínio público Epi Info 3.4.3. A digitação foi efetuada por duas pessoas e em épocas diferentes e, depois de comparadas e validadas, foi criada a versão definitiva. Em seguida foram obtidas distribuições de frequência das variáveis, corrigindo-se eventuais erros. Inicialmente foram obtidas tabelas de distribuição de frequência absoluta e relativa para as variáveis categóricas. Para as variáveis numéricas, foram utilizadas medidas de tendência central e de dispersão.

3.9. Aspectos Éticos

Este estudo foi submetido à análise do Comitê Nacional de Ética do Ministério da Saúde de Angola (Anexo 1), e no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do IMIP, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil e aprovado em 15 de outubro de 2008 sob o nº 1266/2008 (Anexo 2). Foi também submetido à análise da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde do Brasil e aprovado em 28 de julho de 2009 sob o nº 519/2009 (Anexo 3).

Todas as pacientes envolvidas foram devidamente esclarecidas sobre os objetivos da pesquisa e somente incluídas quando concordaram em participar, assinando assim, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

O projeto não envolveu danos físicos ou agravos para as pacientes, por ser um procedimento realizado rotineiramente nas unidades hospitalares que fizeram parte do projeto. Não houve interferência na conduta a ser adotada.

3.9.1. Consentimento Livre e Esclarecido

No momento da consulta para realização da coleta de sangue, foi obtida anuência das pacientes, livre de vícios, dependência, subordinação ou intimidação, após explicação completa e pormenorizada sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta poderia acarretar, formulada em um termo de consentimento. Depois da leitura do termo, cada voluntária assinava-o, autorizando sua participação na pesquisa. O documento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se no Apêndice 1.

IV. RESULTADOS

Artigo: Frequência de resistência primária aos antirretrovirais e variabilidade genética do HIV-1 em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV em Luanda-Angola

ARTIGO

Frequência de resistência primária aos antirretrovirais e variabilidade genética do HIV-1 em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV-1 em Luanda-Angola

Frequency of primary resistance to antiretroviral drugs and genetic variability of HIV-1 among HIV-1 infected pregnant women recently diagnosed in Luanda-Angola

Frequency of primary resistance to antiretroviral drugs and genetic variability of HIV-1 among HIV-1 infected pregnant women recently diagnosed in Luanda-Angola

Emingarda Patrícia André Félix Castelbranco, BSc¹

Edvaldo da Silva Souza, MD, MSc²

Ana Maria Salustiano Cavalcanti, MSc³

Angélica Martins, MSc⁴

Luiz Cláudio Arraes de Alencar, MD, PhD²

¹National Institute of Public Health, Luanda-Angola.

²Institute of Integrated Medicine Prof. Fernando Figueira Recife, Pernambuco, Brazil.

³Central Public Health Laboratory for the State of Pernambuco (LACEN/PE), Recife, Pernambuco Brazil.

⁴Molecular Virology Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author:

Luiz Cláudio Arraes de Alencar

Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista

Recife – PE – Brasil CEP 50.070-550

Telefones: (81) 2101-2564, (81) 9961-2220

Email: lularraes@imip.org.br

Abstract

Background: the determination of the prevalence of primary resistance to antiretroviral therapy in different places in the world is of extreme importance in molecular epidemiology monitoring and it can guide the initial patient therapy in a given geographical area. **Objectives:** to determine the frequency of primary resistance to antiretroviral and describe the genetic variability of HIV-1 in newly diagnosed HIV infected pregnant women in maternities Lucrecia Paim e Augusto N'Gangula in Luanda-Angola. **Methods:** biological samples of 57 pregnant women recently diagnose HIV positive participating in the MCTC program from Luanda-Angola were collected between November 2008 and January 2009 and were tested for viral load quantification and TCD4+. Molecular characterization of HIV was performed by OpenGene DNA sequencing system of genome HIV-1_{LAV-1}. in the *pol* region. **Results:** 36 (63.2%) out of 57 samples were sequenced, one (2,8%) mutation associated with resistance nucleoside reverse transcriptase inhibitors was detected and two (5.6%) mutations associated with resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors were also detected. Primary mutations associated with ITRNN and ITRN were detected in two (5.6%) pregnant newly diagnosed HIV-1 infected women. None of the primary mutations associated with protease inhibitors was found. Subtypes A1, C, D, CRF02_AG, F1, G, H and J were detected. **Conclusion:** the presence of primary resistance in this treatment-naive pregnant population was low, but the genetic variability in Angola was very high.

Keywords: HIV infection, viral resistance, antirretroviral drugs, pregnancy.

Introduction

The pandemic of the human immunodeficiency virus (HIV) infection remains a cause of public health study in the world, being declared since June 2001 a global security emergency in the General Assembly of the United Nations ¹.

Sub-Saharan Africa (SSA) is the area most affected by HIV the virus that causes the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), with a total of approximately 22,5 million people infected by the end of 2007, representing more than $\frac{3}{4}$ of deaths from AIDS in the world ².

The first case of AIDS in Angola, a country located in SSA with a 17 million for the total population, was diagnosed in 1985, since this date until December 2007 approximately 190,000 Angolans were infected by HIV representing a total prevalence of 2.1%, and 110,000 were women and 17,000 were children under 15 years ¹.

Access to antiretroviral therapy (ART) has increased dramatically in limited resource settings, where the majority of people infected with HIV and who need treatment resides ¹. In Angola the universal access to antiretroviral medicine started in 2004 and since this time approximately 11,240 people infected had access to treatment ³. Gaining access to antiretroviral drugs has implications for improving the quality of life for people living with HIV/AIDS, the prevention of vertical transmission as well as the emergence and transmission of antiretroviral resistant virus strains ⁴.

The treatment in Angola includes a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) Zidovudine (AZT) and Lamivudine (3TC), and a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) Efavirenz (EFV) or Nevirapine (NVP) ³. A study conducted in Angola, showed that the surveillance of antenatal care pregnant

women as a sentinel population represented the prevalence of the HIV-1 infections in the general population ⁵.

The program for the prevention of vertical transmission (PTV) in Angola began in 2004 with the aim to support all HIV positive pregnant women, since the first prenatal consultation until birth, as well as the new born, aimed for the reduction of Mother to Child Transmission (MTCT) of HIV and the schema used is AZT. 3TC and NVP ⁶.

The MTCT is the most important source of HIV infection in children under 15 years. This affects approximately 500,000 children per year in the world and is responsible for 1,800 new infections in children daily, in most developing countries. The rate of transmission in treatment naïve women to a child is 15% to 25% in developed countries and 25% to 45% in developing countries ⁷.

The vertical transmission of HIV-1 resistant variants of the reverse transcriptase inhibitors has also been reported in the literature, and some studies noted that resistance mutations have been transmitted ⁸⁻¹⁰.

Incomplete adherence to antiretroviral therapy has been documented to be a primary contributing factor for treatment failure and the development of antiretroviral resistance among patients in resource-limited settings ¹¹.

The increasing prevalence of resistance to antiretroviral drugs between patients infected with HIV-1 has been associated with increased transmission virus resistant strains to newly infected individuals. The effectiveness of the initiation of treatment with antiretroviral may be limited by transmitting virus resistant strains ¹². And the rate at which the transmission of mutation associated with resistance reverts to the wild-type has not been fully outlined, but the mutations present at the time of transmission of HIV

are more stable than those selected under pressure from antiretroviral drugs¹³. In this way, performing the genotyping test before treating a patient recently infected by HIV can increase the rate of therapeutic antiretroviral drugs response¹⁴.

The studies on mutations associated with resistance in pregnant women in Africa are limited, particularly in Angola, being extremely important to investigate and describe the mutations associated with antiretroviral drugs in the RT and PR genes of HIV-1 in treatment-naïve pregnant women.

The aim of the present study is to report the frequency of primary mutations in PR and RT that are associated with antiretroviral drug resistance to describe the subtype variability of the HIV-1 in treatment-naïve pregnant women living in Luanda.

Methods

Study subjects and samples

A total of 57 treatment-naïve pregnant women on prenatal consultation were diagnosed with HIV infection during the months of November 2008 to January 2009, in Lucrecia Paim and Augusto N'Gangula maternities and were included in the study. All pregnant women underwent pre- and post-test counseling and signing the informed consent form prior to participating in the study. They were included if pregnant women that: (I) had been recently diagnosed for HIV-1 (ii) were on prenatal consultation included in PTV (iii) had not been taking antiretroviral drugs previously (iv) were more than 18 years old.

Blood samples and demographic, clinical and epidemiological information were collected during the period of the collection. Plasma was aliquoted stored at a temperature of -70 °C immediately after separation.

The serology of HIV-1 was performed based on the Angolan National Algorithm using two rapid tests for antibodies to HIV-1¹⁵. HIV antibodies test were performed in the maternities using two rapid tests Determine[®] (Abbott Laboratories, IL, USA)¹⁶ and Unigold[®] (Trinity Biotech)¹⁶. Discordant results were sent to the National Institute of Public Health (NIPH) to be performed an additional test using ELISA (Vironostika HIV Uni-form II Ag/Ab ELISA test; bioMérieux, France)¹⁷.

CD4 lymphocyte count, viral load, RNA extraction, RT PCR and sequencing

- The CD4 lymphocyte count was processed using Becton Dickinson FacsCount; equipment¹⁸ in the NIPH in Luanda-Angola.
- The viral load quantification was determined in 1ml using of plasma amplification technology based on nucleic acid sequence (NASBA)¹⁹ NucliSens HIV QT system was developed based on the technology *in vitro* NASBA, as if of the replication cycle of HIV-1 *in vivo*. It is capable of detecting in a single response a variable value of viral load in a range of 40 to 10.000.000 copies in the sample tested; it was performed in the National Institute of Fighting Against AIDS in Luanda-Angola.
- RNA extraction was performed using QIAamp viral nucleic acid extraction kit under conditions recommended by the manufacturer (Qiagen, Valencia, CA,USA)²⁰ in the Central Public Health Laboratory for the State of Pernambuco in Brazil.
- The RT and PCR were performed by using a one step RT-PCR TruGene kit²¹ to obtain an amplified product from HIV-1 *pol* gene. Followed by the CLIP sequencing reaction by using a 7-deaza-dGTP Cy5/Cy5 dye primer cycle sequencing kit (Siemens) according to the manufacturer's instructions.

Fragments were separated on a TruGene tower (Siemens) at 60°C, 1,600 V, 50% laser power, and a sampling rate of 0.5 seconds for 60 minutes with a size 500 polyacrylamide gel.

The drug-resistant results were analyzed according to the Calibrated Population Resistance Tool (CPR) Version 4.1 beta that uses the Surveillance Drug Resistance Mutation 2009 ²² and the genetic subtype was determined by genotypic resistance mutation interpretation algorithm program version 6.0.3 (<http://hivdb.stanford.edu/>).

The study was approved by the Ethics Committee of Angola, Ethics Committee of Human Research of the Institute of Integrated Medicine Prof. Fernando Figueira and the National Commission on Ethics in Research of the Ministry of Health of the Federative Republic of Brazil.

Results

Study samples

A total of 57 samples were collected, 36 (63.2%) out of the 57 samples HIV-1 *pol* gene sequences were successfully generated; the other 21 samples were lost, 13 samples were viral load less than a 1000 copies/ml, even though we could sequenced two samples that were less than a 1000 copies/ml and the other 8 samples we had some laboratories problems, we repeated the sequencing sessions more than twice but we could not generate any results. Table 1 summarizes demographic and epidemiological characteristics of the study population.

HIV-1 pol subtyping

HIV-1 *pol* subtypes in both regions were different from some samples. Subtype F was the prevalent one with 22,2% of all, following subtypes C(19.4%), D(13.9%), A1(11.11%), CRF02_AG(11,11%), G(8.3%), H(5.6%), J(2,8%). Distribution of HIV-1

subtypes in the two regions is summarized in Table 2, and the phylogenetic tree is showed in figure 1.

Protease inhibitor (PI) resistance-associated mutations among treatment-naïve HIV-1 infected pregnant women

None of the known primary mutations associated with PI resistance was detected among PR sequences from the two regions. Secondary mutations were found at positions T74S (2.8%), L10V (25%) and L10I (11,1).

Reverse transcriptase inhibitor (RTI) resistance-associated mutations among treatment-naïve HIV-1 infected pregnant women

Primary mutations associated with NRTI were found at positions M184V (2.8%) while secondary mutations were found at positions T69S (2.8%) and V118I (2.8%). Primary mutations associated with NNRTI were found at positions K101E (2.8%), G190A (5.6%) while secondary mutations were found at positions K238T (2.8%).

Discussion

The median age of the pregnant women was 28 years and the median of the gestational age were 20 weeks. Data addressing the prevalence of primary mutations associated with antiretroviral resistance treatment-naïve individuals infected with HIV-1 in Sub-Saharan Africa (SSA) is limited. Reports from Uganda ²³, Rwanda ²³, Mozambique ²⁴, Zambia ²⁵, South Africa²⁶, Swaziland ²⁷ Malawi²⁸ and Tanzania ²⁹ indicated a low prevalence of primary mutations associated with antiretroviral resistance among treatment-naïve individuals infected with HIV-1.

This study provides the first report of primary mutations associated with antiretroviral resistance among antiretroviral treatment-naïve pregnant women in Angola. In

accordance with other reports from SSA, a low prevalence of primary mutations associated with antiretroviral resistance was found among treatment-naïve pregnant women in Luanda.

Some laboratories problems were found the sequencing procedure test has some limitations, in order to obtain an amplified product from HIV-1 *pol* gene, the viral load has to be more than a 1000 copies of RNA/ml in the sample tested and this test was also developed for HIV-1 subtype B³⁰ and we could see how high is the genetic variability of the HIV-1 in this samples.

Only one primary mutation associated with NRTI resistance, M184V, which causes high-level in vitro resistance to Lamivudina (3TC) and Emtricitabine (FTC) and low level in vitro resistance to Didanosine (DDI) and Abacavir (ABC). It increases susceptibility to Zidovudine (AZT), Tenofovir (TDF) and Stavudine (D4T), was observed in one strain from Luanda. And two secondary mutations associated with NRTI resistance, T69S which is selected mutations but their effect on NRTI susceptibility is not known and V118I which occurs in ~2% of untreated persons and with increased frequency in persons receiving multiple NRTIs. It causes low-level resistance to 3TC and possibly to other NRTIS when present with E44A/D and/or one or more TAMs.

Two primary mutations associated with NNRTI resistance were detected, K101E which causes intermediate resistance to Nevirapine (NVP) and Delavirdine (DLV) and low level resistance to Efavirenz (EFV) and Etravirine (ETR) and G190A that causes high-level resistance to NVP, intermediate resistance to EFV, and increased DLV susceptibility. And only one secondary mutation associated with NNRTI resistance

K238T which is selected mutations that usually occur in combination with K103N in which case it causes high-level resistance to NVP, EFV and DLV.

No primary mutations associated with PI resistance was detected in this study but three secondary mutations associated with PI resistance, T74S which is associated with reduced NFV susceptibility and it occurs in untreated persons with subtype C viruses and L10I/V is associated with resistance to most PIs when presented with other mutations. It occurs in 5-10% of untreated persons as in this study.

The low prevalence or lack of primary mutations associated with antiretroviral resistance in Luanda reflects the limited use of antiretroviral drugs in this region to date.

Currently nine subtypes have been identified in group "M", A, B, C, D, F, G, H, J and K. Each subtype is associated with a specific geographical location, multiple subtypes non recombinant have already been described more than 43 Circulating Recombinant Forms (CRF). Sub-type C accounts for almost half of all new infections and predominates in Eastern and Southern Africa, India and Nepal. Subtypes A, D, G, H and K were detected in different regions in Africa. The subtype F is common in Central Africa, South America in Eastern Europe, while the subtype J is unique from Central America. The subtype B is predominant in the Western world (Europe, South America and North, Japan and Australia) ³¹.

In the SSA are found more than 75% of HIV-1 infection in the world and the numerous local epidemiology of Africa are characterized by several subtypes current non-B, CRFs and Unic Recombinant Forms (URF) ³².

The variability of the subtype in Angola is very high, a total of 36 samples were sequenced in *pol* gene for RT and PR regions. These samples were identified by the genotypic resistance mutation interpretation algorithm program version 6.0.3 in which the results to be considerate is the one that we generated after phylogenetic analyses, using a MEGA program version 3.1, and the Neighbour Joining with the Kimura 2 parameters model. Alignment with the standard sequence was performed with the BioEdit Program that is incorporated with Clustal W. and it was also used a reliability test, the Bootstrap of 1000 replicates and the results are showed on Figure 1 that shows the phylogenetic tree. HIV-1 *pol* subtypes were F(22.2%), C(19.4%), D(13.9%), A1(11.11%), CRF02_AG(11,11%), G(8.3%), H(5.6%), J(2,8%) and two subtypes that was unclassified. This is not uncommon in this region of Africa and is probably related to the tremendous genetic variability of HIV-1³³⁻³⁵. We have detected the rare H and J subtypes in some samples. Some strains from Angola have little organized substructure and form weaker clusters within phylogenetic trees than the global reference sequences, not allowing a clear distinction between subtypes. As a consequence, the current global subtype classification may not reflect the extent of diversity in this region. Further analysis with the genomic sequences will be need to clarify whether these Angolan strains are ancestor viruses, pure subtypes or represent new genetic forms of HIV-1.

The high genetic diversity of HIV-1 found in Angola suggests that, HIV-1 is circulating in Angola for a long time and, suggests also that there is intense population mobility between Angola and Republic Democratic of Congo.

Conclusion

The results of this first study among treatment-naïve HIV-1 infected pregnant women in Luanda-Angola reveals that the baseline frequency of primary mutations that confer

resistance to antiretroviral drugs may be classified as low and these results need to be confirmed by investigation in different regions of the country, such as Cunene where the prevalence of HIV-1 is higher. Furthermore, additional studies addressing the fitness of viral strains carrying polymorphic mutations and the evolution of HIV-1 and phylogenetic analyses may be relevant for public health measures in Angola.

There was a very high genetic diversity of HIV-1 in Angola is probably related to its close geographical proximity with several countries in Central Africa with old human HIV-1 infection such as the Democratic Republic of Congo.

References

1. UNAIDS. 2008 UNAIDS Annual Report Available at http://data.unaids.org/pub/Report/2009/jc1736_2008_annual_report_en.pdf.
2. http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/EFS2008/short/EFSCountryProfiles2008_AO.pdf.
3. Ministry of Health-Republic of Angola, Guidelines for antiretroviral treatment in Angola. 2005
4. Palella FJ Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD: Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338:853-860.
5. Ministry of Health-Republic of Angola, National Institute of Fighting Against AIDS-Surveillance study of HIV, Hepatitis B and Syphilis in pregnant women on prenatal consultation in Angola, 2006
6. .Ministry of Health-Republic of Angola, National Institute of the fight against AIDS: Guidelines for the prevention of HIV transmission in Angola, 2005.
7. Guidelines for the Prevention of Mother to Child Transmission of HIV. National AIDS Control Organization. Available at: http://www.nacoonline.org/guidelines/guideline_9.pdf.
8. Colgrove RC, Pitt J, Chung PH, Welled SL, Japour AJ: Selective Vertical transmission of HIV-1 antiretroviral resistance mutations. *AIDS* 1998; 12: 2281-2288.
9. Kamkamidze G, Sullivan T, Charbonneau T: Occurrence of HIV-1 reverse transcriptase gene mutation at codon 215 in HIV-infected infants. *J. Clin. Virol* 2001; 22: 143-148.

10. Bauer GR, Colgrove RC, LaRussa PS, Pitt J, Welles SL: Antiretroviral resistance in viral isolates from HIV-1 transmitting mothers and their infants. *AIDS* 2006; 20: 1707-1712.
11. Hogan DR, Salomon JA. Prevention and Treatment of Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immunodeficiency Syndrome in Resource limited settings. *Bulletin of the WHO*, 2005; 83:2
12. Little, SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M , Collier AC: Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV N. *Engl.J. Med* 2002; 347: 385-394
13. Novak RM, Chen L, MacArthur RD, Baxter JD, Hullslek KH, Grace P: Prevalence of antiretroviral drug mutations in chronically HIV-infected, treatment-naïve patients: implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40: 468-474.
14. Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E: HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999; 282: 1135-1141.
15. Ministry of Health of Angola, National Institute of Fighting Against AIDS- Algorithm serological diagnosis of HIV infection in individuals older than 2 years with simple and quick tests, 2004.
16. Arai H, Petchclai B, Khupulsup K, Kurimura T, Takeda K. Evaluation of a rapid Immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 367-70.
17. van Binsbergen J, Keur W, Siebelink A, van de Graaf M, Jacobs A, de Rijk D, Nijholt L, Toonen J, Gürtler LG. Strongly enhanced sensitivity of a direct anti-HIV-

- 1/-2 assay in seroconversion by incorporation of HIV p24 ag detection: a new generation vironostika HIV Uni-Form II. *J Virol Methods*. 1998; 76: 59-71.
18. Lyamuya EF, Kagoma C, Mbena EC, Urassa WK, Pallangyo K, Mhalu FS, Biberfeld G. Evaluation of the FACScount, TRAx CD4 and Dynabeads methods for CD4 lymphocyte determination. *J Immunol Methods*. 1996;195: 103-12.
19. Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukink R, Dircks M, Adriaanse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid Amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods*. 1991 ;35: 273-86.
20. Fischer M, Huber W, Kallivroussis A, Ott P, Opravil M, Lüthy R, Weber R, Cone RW. Highly sensitive methods for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma, cells, and tissues. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1260-4.
21. Jagodzinski LL, Cooley JD, Weber M, Michael NL. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 998-1003.
22. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme AM, Sandstrom P, Boucher CA, van de Vijver D, Rhee SY, Liu TF, Pillay D, Shafer RW. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009;4: e4724.
23. Galluzzo CM, Germinario EA, Bassani L, Mancini MG, Okong P, Vyankandondera J, Vella S, Giuliano M. Antiretroviral resistance mutations in

- untreated pregnant women with HIV infection in Uganda and Rwanda. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23 :1449-51.
24. Bellocchi MC, Forbici F, Palombi L, Gori C, Coelho E, Svicher V, D'Arrigo R, Emberti-Gialloreti L, Ceffa S, Erba F, Marazzi MC, Silberstein FC, Perno CF. Subtype analysis and mutations to antiviral drugs in HIV-1-infected patients from Mozambique before initiation of antiretroviral therapy: results from the DREAM programme. *J Med Virol*. 2005;76 : 452-8.
25. Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Yamashita A, Deng X, Mulundu G, Ichiyama K, Munkanta M, Yokota T, Wakasugi N, Tezuka F, Yamamoto N, Ito M. Prevalence of drug-resistance-associated mutations in antiretroviral drug-naïve Zambians infected with subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003; 19:151-60.
26. Pillay V, Ledwaba J, Hunt G, Rakgotho M, Singh B, Makubalo L, Bennett DE, Puren A, Morris L. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naïve HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir Ther*. 2008;13:101-7.
27. Maphalala G, Okello V, Mndzebele S, Gwebu P, Mulima N, Dlamini S, Nhlabatsi B, Ginindza T, Ghebrenigus Y, Ntilivamunda A, Mwanyumba F, Ledwaba J, Pillay V, Bennett DE. Surveillance of transmitted HIV drug resistance in the Manzini-Mbabane corridor, Swaziland, in 2006. *Antivir Ther*. 2008; 13:95-100.

28. Kamoto K, Aberle-Grasse J; Malawi HIV Drug Resistance Task Force. Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi. *Antivir Ther.* 2008; 13:83-7.
29. Nyombi BM, Holm-Hansen C, Kristiansen KI, Bjune G, Müller F. Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Ther.* 2008; 21:13.
30. Kuritzkes, D. R., R. M. Grant, P. Feorino, M. Griswold, M. Hoover, R. Young, S. Day, R. M. Lloyd, Jr., C. Reid, G. F. Morgan, and D. L. Winslow. 2003. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit and the OpenGene DNA sequencing system. *J. Clin. Microbiol.* 41:1594–1599.
31. Julg B, Goebel FD (2005) HIV Genetic Diversity: Any implications for drug resistance? *Infection* 33: 299-301.
32. Rhee SY, Kantor R, Katzenstein DA, Camacho R, Morris L, Sirivichayakul S, Jorgensen L, Brigido LF, Schapiro JM, Shafer RW: HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. *AIDS* 2006; 20: 643-651.
33. Kalish ML, Robbins KE, Pieniazek D, Schaefer A, Nzilambi N, Quinn TC, St Louis ME, Youngpairoj AS, Phillips J, Jaffe HW, Folks TM. Recombinant viruses and early global HIV-1 epidemic. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:1227-34.
34. McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol.* 2006; 78:S7-S12.
35. Badreddine S, Smith K, van Zyl H, Bodelle P, Yamaguchi J, Swanson P, Devare SG, Brennan CA. Identification and characterization of HIV type 1 subtypes

present in the Kingdom of Saudi Arabia: high level of genetic diversity found. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 May; 23:667-74.

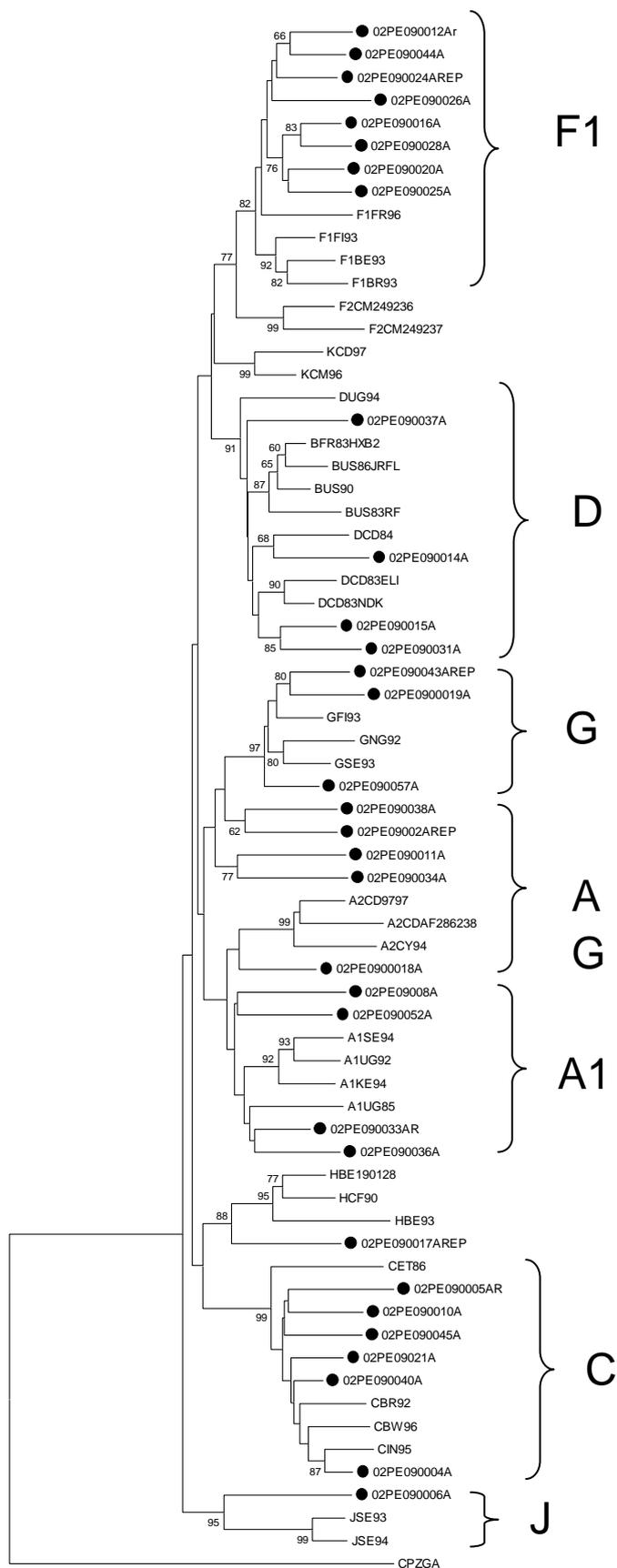


Fig.1. Phylogenetic analysis of HIV *pol* sequences from HIV-1 infected pregnant women in Luanda-Angola. The study and reference sequences were aligned by the Cluster W programme and tree constructed by neighbour-joining method based on the Kimura two-parameter and viewed using a Mega 3.1 software.

Table 1. Characteristics of 57 HIV-1 seropositive pregnant women included in a study for the prevalence of primary and secondary mutations associated with antiretroviral drug resistance conducted from November 2008 to January 2009 in Luanda-Angola.

Characteristics N=57		
Age (Years)	Median	28
	Range	18-39
Viral load (copies/ml)	Median	7100
	Range	230-190000
CD4+ (cells/mm ³)	Median	285
	Range	31-1269
Gestational age (week)	Median	20
	Range	5-36

Table 2. Subtypes found in 36 samples study in accordance with Stanford University HIV-1 Drug Resistance Database.

Sample Identification	Stanford		CPR/Stanford
	PR	RT	
02	CRF02_AG	G	CRF02_AG
04	C	C	C
05	C	C	C
06	J	CRF13_cpx	J
08	A	A1	A1
09	H	H	H
10	C	C	C
11	G	CRF02_AG	CRF02_AG
12	D	F1	F
14	D	D	D
15	B	D	D
16	D	F1	F
17	A	H	H
18	G	U	U
19	G	G	G
20	D	F1	F
21	C	C	C
24	D	F	F
25	D	F1	F
26	D	F	F
28	D	F	F
31	D	D	D
32	CRF02_AG	H	H
33	A	A1	A1
34	G	CRF02_AG	CRF02_AG
35	CRF01_AE	D	D
36	A	A1	A
37	D	D	D
38	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
40	C	C	C
41	C	C	C
43	G	G	G
44	D	F	F
45	C	C	C
52	A	A	A
57	G	G	G

Abbreviations: PR-Protease, RT-Reverse Transcriptase, CPR- Calibrated Population Resistance Tool, U-Untyped

Figura 1.

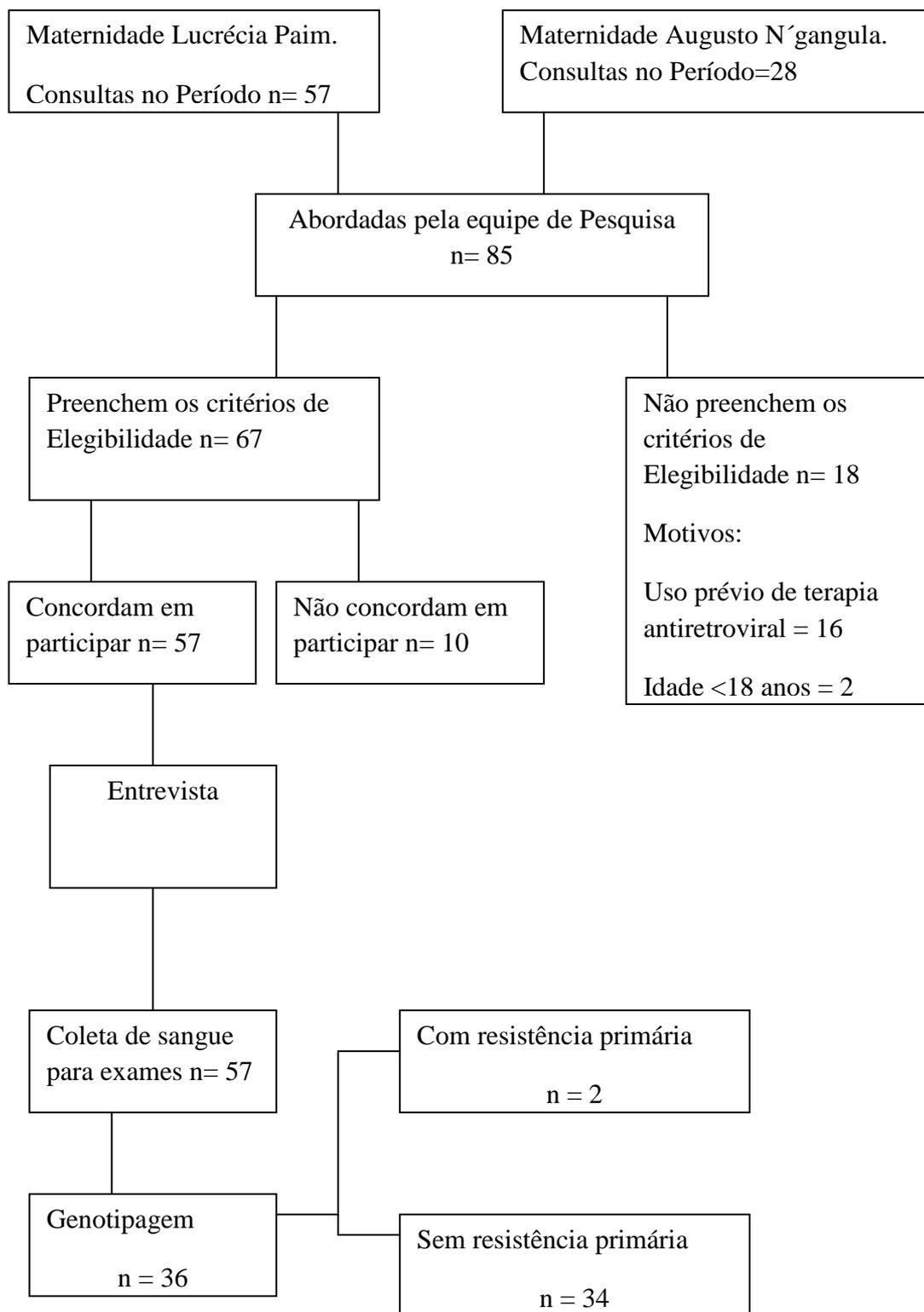


Fig.1. Fluxograma de Captação e acompanhamento das participantes

V.CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo revelaram que a prevalência de resistência primária em gestantes recentemente diagnosticadas para o HIV-1 em Luanda foi a esperada, ou seja, baixa por Angola ser um país de baixo nível de exposição as drogas antirretrovirais, este estudo também mostrou como é alta a variabilidade genética do HIV-1 na protease e na transcriptase reversa do gene *pol* do genoma mas, estudos de filogenia genética precisam ser feitos para melhores esclarecimentos quanto aos subtipos circulantes em Angola.

Mostrou também que 56% das gestantes aderiram ao PTV depois das 14 semanas de gestação o que contradiz o indicado para a eficácia da transmissão vertical.

Tendo em conta da propagação do vírus em África, especificamente em Angola, em particular em mulheres grávidas há uma grande necessidade de se efectuar os testes de genotipagem, visto que a adesão adequada ao tratamento e os testes de genotipagem constituem os principais factores a serem considerados para o sucesso da Terapia anti-retroviral potencializada para a profilaxia de prevenção de mãe para filho.

VI. REFERÊNCIAS

1. U.S. Department of State-Diplomacy in Action. Available at: <http://www.state.gov/r/pa/ei/bgn/6619.htm>
2. Myatt M, Bennett DE. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antivir Ther.* 2008; 13: 37-48.
3. Lyamuya EF, Kagoma C, Mbena EC, Urassa WK, Pallangyo K, Mhalu FS, Biberfeld G. Evaluation of the FACScount, TRAx CD4 and Dynabeads methods for CD4 lymphocyte determination. *J Immunol Methods.* 1996; 195: 103-12.
4. Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods.* 1991; 35: 273-86.
5. Jagodzinski LL, Cooley JD, Weber M, Michael NL. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J Clin Microbiol.* 2003, 41: 998-1003.
6. Fischer M, Huber W, Kallivroussis A, Ott P, Opravil M, Lüthy R, Weber R, Cone RW. Highly sensitive methods for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma, cells, and tissues. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1260-4.

VII. APÊNDICES

APÊNDICE 1.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



REPÚBLICA DE ANGOLA
MINISTÉRIO DA SAÚDE
MATERNIDADE LUCRÉCIA PAIM

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS EM MULHERES GESTANTES SOROPOSITIVAS PARA O VIH, VINCULADAS AO PROGRAMA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL (PTV), NAS MATERNIDADES LUCRÉCIA PAIM E AUGUSTO N'GANGULA EM LUANDA-ANGOLA.

Pesquisadora Responsável: EMINGARDA PATRÍCIA ANDRÉ FÉLIX CASTELBRANCO.

Instituição a que pertence a Pesquisadora Responsável: INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA.

Telefones para contato: (923) 619841 - (924) 221010 - (912) 332048

Nome da voluntária: _____

Idade: _____ anos Bilhete de Identidade N°. _____

A Senhora está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Prevalência de Resistência Primária Aos Antirretrovirais em mulheres gestantes soropositivas para o VIH, vinculadas ao Programa Prevenção Da Transmissão Vertical (PTV), nas Maternidades Lucrecia Paim e Augusto N’Gangula em Luanda-Angola

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar o problema de resistência primária em Angola é porque o vírus deixa de responder aos remédios quando ocorre resistência, e como a Sr^a vai tomar os remédios para prevenir a transmissão do vírus ao seu bebê é importante saber se tem alguma resistência para o médico saber que tipo de medicação a Sr^a vai poder tomar.

O objetivo deste estudo é para determinar a prevalência de resistência na Lucrecia Paim e no N’Gangula. O procedimento para a coleta de dados e de material serão da seguinte forma: a Sr^a vai precisar preencher um formulário para que se possam coletar alguns dados seus e depois serão coletados nove ml e sangue, o primeiro teste é o CD4 que é para ver como está o seu sistema de defesa, o segundo é a carga viral, para ver quantas cópias de vírus estão circulando no seu sangue e o terceiro e último que é o teste de genotipagem é para ver se tem alguma resistência aos medicamentos.

DESCONFORTOS E RISCOS ASSOCIADOS: Terá um risco mínimo, mas como a Sr^a vai fazer as análises de rotina do pré-natal, a técnica de laboratório vai retirar um pouco de sangue a mais para a pesquisadora poder realizar os outros testes e um dos benefícios para a Sr^a é que vai ficar sabendo como está o seu sistema de defesa, a quantidade de

vírus circulando no seu organismo e se tem alguma resistência aos medicamentos e caso seja descoberta alguma resistência o médico saberá que medidas tomar.

BENEFÍCIOS ESPERADOS (PARA A VOLUNTÁRIA E/OU PARA A COMUNIDADE): Os resultados desta pesquisa serão úteis para você porque irá lhe mostrar se tem alguma resistência de forma a que se tiver, o médico irá tomar a decisão certa.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Caso você apresente algum problema em seus exames clínicos você será acompanhado e encaminhado para o tratamento adequado ao tipo de resistência.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O atendimento clínico prosseguirá com qualidade independente da participação na pesquisa.

A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial e da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Instituto Nacional de Saúde Pública e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e se

vier a sofrer qualquer tipo de dano resultante da sua participação, além do direito à assistência integral a Sr^a será indenizada.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE

Eu, _____ B.

I Nº _____ registro hospitalar _____, fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A pesquisadora EMINGARDA PATRÍCIA ANDRÉ FÉLIX CASTELBRANCO funcionária do INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora *Emingarda Patrícia André Félix Castelbranco* através dos telefones (923) 619 841 e (924) 221 010 ou me dirigir ao Comitê de Ética em Pesquisa no telefone (222) 393247 ou (222) 395881.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido, tive a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

APÊNDICE 2

Instrumento para coleta dos dados e resultado dos exames



REPÚBLICA DE ANGOLA

MINISTÉRIO DA SAÚDE

MATERNIDADE AUGUSTO N'GANGULA

FORMULÁRIO DA GESTANTE

Nº _____

1.Data de entrevista: ___/___/___ 2. Numero de Registo <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
3. Nome Completo: _____		
4.Idade <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos	5. Raça 1.Negra <input type="checkbox"/> 2.Branca <input type="checkbox"/> 3.Mulata <input type="checkbox"/>	
Dados sócio-demográficos		
6. Escolaridade 1.Analfabeta <input type="checkbox"/> 2.Primário <input type="checkbox"/> 3.Secundário <input type="checkbox"/> 4.Ensino Médio <input type="checkbox"/> 5Curso Superior <input type="checkbox"/>	7. Estado Civil 1.Solteira <input type="checkbox"/> 2.Casada <input type="checkbox"/> 3.Divorciada <input type="checkbox"/> 4. Viúva <input type="checkbox"/> 5. União Estável <input type="checkbox"/>	8. Nível sócio-económico 1.Desempregada <input type="checkbox"/> 2.Funcionária Pública <input type="checkbox"/> 3.Funcionária Privada <input type="checkbox"/> 4.Vendedora comerciante <input type="checkbox"/> 5.Patroa <input type="checkbox"/> 6.Profissional ou executiva <input type="checkbox"/> 7. Empresária <input type="checkbox"/>
9.Procedência (área) 1. Município _____ 2. Província _____	10. Religião 1. Católica <input type="checkbox"/> 2.Protestante <input type="checkbox"/> 3. Muçulmana <input type="checkbox"/> 4. Outro <input type="checkbox"/>	11. Renda Familiar <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
12. Número de parceiros <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Dados obstétricos		
13.Nº de gestações <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	14.Nº de partos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	15.Idade gestacional em semanas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Dados clínicos		
16. Estádio clínico de acordo com o Protocolo do CDC 1.I <input type="checkbox"/> 2.II <input type="checkbox"/> 3.III <input type="checkbox"/> 4.IV <input type="checkbox"/>	17. Contagem dos linfócitos TCD4+ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> /mm ³	18.Quantificação da Carga viral <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> cópias/ml
19. Grupo do VIH-1	20. Subtipos do grupo M	21. Resistência aos anti-

1.M <input type="checkbox"/> 2. N <input type="checkbox"/> 3.O <input type="checkbox"/>	1.A <input type="checkbox"/> 2.B <input type="checkbox"/> 3.C <input type="checkbox"/> 4.D <input type="checkbox"/> 5.F <input type="checkbox"/> 6.G <input type="checkbox"/> 7.H <input type="checkbox"/> 8.J <input type="checkbox"/> 9.K <input type="checkbox"/> 10.CRFs <input type="checkbox"/>	retrovirais 1. ITRN <input type="checkbox"/> 2. ITRNN <input type="checkbox"/> 3.IP <input type="checkbox"/>
---	--	---

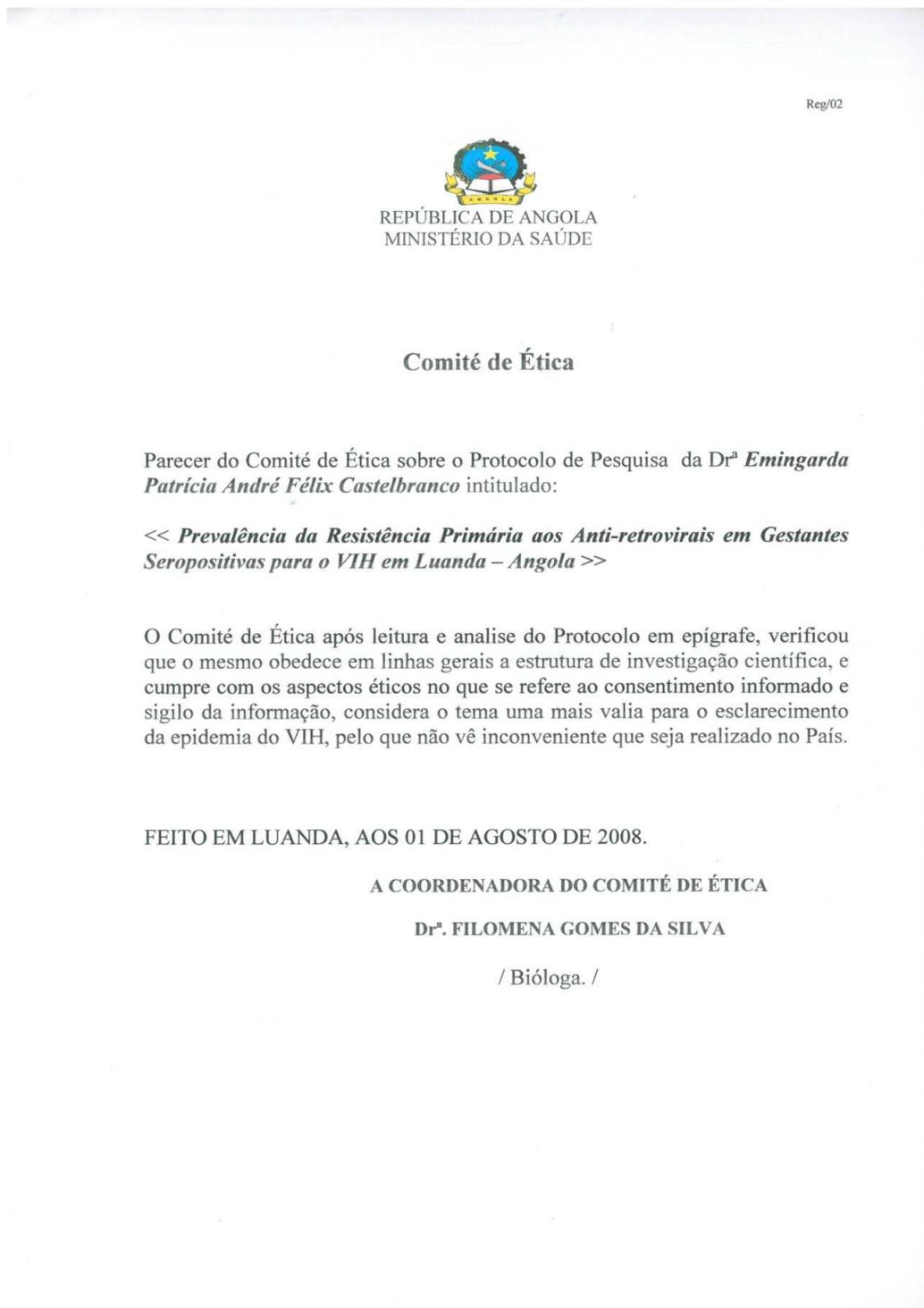
Data da 1ª revisão: __/__/____

Entrevistador: _____

Data da 2ª revisão: __/__/____

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Aprovação do Comité de Ética de Angola



ANEXO 2: Aprovação do Comitê de Ética do IMIP

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica

**DECLARAÇÃO**

Declaro que o projeto de pesquisa nº 1266 intitulado “Prevalência da resistência primária aos anti-retrovirais em gestantes soropositivas para o VIH em Luanda-Angola” apresentado pela pesquisadora **Emingarda Patrícia André Félix Castelbranco** foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião de 09 de outubro de 2008. Entretanto esclarecemos que o projeto pertence a uma área temática especial e será enviado a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP a fim de emissão de parecer final.

Recife, 15 de outubro de 2008.


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei. 9851 de 08/11/67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei. 5013 de 14/05/64
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL - 05.897-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento
CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhoos, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550
PABX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393
e-mail: imip@imip.org.br
www.imip.org.br

ANEXO 3: Aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 519/2009

Registro CONEP: 15217 (Esta nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0134.0.099.099-08

Processo nº 25000.001504/2009-14

Projeto de Pesquisa: *"Prevalência da resistência primária aos anti-retrovirais em gestantes soropositivas para o HIV em Luanda- Angola"*.

Pesquisador Responsável: Emingarda Patrícia André Félix Castelbranco

Instituição: Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira/PE

CEP de origem: Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira/PE

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: Laboratório Central de Saúde Pública – Dr. Milton Bezerra Sobral.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 299/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Foi apresentada Folha de Rosto atualizada e corrigida
2. Foi esclarecido que, após o final do estudo, as amostras biológicas serão desprezadas e incineradas, e que tanto o material biológico coletado como os dados obtidos serão usados única e exclusivamente para a finalidade prevista no estudo.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 28 de julho de 2009.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)