



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

DIAGNÓSTICO GENÉTICO E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DE UM MÉTODO DE “NESTED” RT-PCR

EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA

IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1)

Dissertação para a obtenção do título de
Mestre em Diagnóstico Genético e
Molecular.

RENATA TICIANI

Orientador: Prof. Dr. VAGNER RICARDO LUNGE

CANOAS

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Trabalho desenvolvido e financiado pela Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, FINEP (Convênios 0.1.05.0124.00 – 2004 e 0.1.07.0102.00 – 2006) e Laboratório Simbios Biotecnologia.

Dedico este trabalho aos meus familiares, namorado e amigos, especialmente aos meus pais que me apoiaram durante todos os anos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, aos meus pais e namorado pela compreensão e apoio, aos meus familiares, amigos e funcionários do Laboratório Simbios Biotecnologia e Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) pela companhia e auxílios prestados e, aos meus professores, especialmente ao meu orientador, pela amizade, ampliação dos meus conhecimentos e orientação durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE:

RESUMO	06
ABSTRACT	07
CAPÍTULO 1	08
INTRODUÇÃO	08
1. Histórico	08
2. Descrição do vírus	10
3. Epidemiologia	11
4. Transmissão	13
5. Replicação viral	13
6. Patogenicidade e Fases da Infecção	14
7. Tratamento	17
8. Diagnóstico	20
8.1. Detecção	20
8.2. Quantificação	22
OBJETIVOS	26
CAPÍTULO 2	27
ARTIGO: “ Evaluation of a real-time nested RT-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)”	28
CAPÍTULO 3	49
DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	63
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	63

RESUMO:

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que acomete aproximadamente 33,2 milhões de pessoas no mundo todo, sendo que quase todas estão infectadas pelo HIV tipo 1 (HIV-1). A quantificação do HIV-1 (carga viral) e a determinação dos níveis de células T CD4⁺ são parâmetros essenciais para os monitoramentos da progressão da infecção e do tratamento com anti-retrovirais. Os testes comerciais disponíveis para avaliar a carga do HIV-1 são, em sua grande maioria, baseados em metodologias de quantificação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). O presente trabalho descreve e avalia uma técnica de “nested” RT-PCR em tempo real para quantificação do RNA do HIV-1 plasmático. Os resultados obtidos demonstraram que a técnica apresentou alta especificidade e boa correlação ($R^2 = 0,943$) entre a carga viral (em $\log_{10}$ cópias de RNA/mL) e o ciclo limite de detecção (“threshold cycle” ou simplesmente C_T) determinada a partir da análise de várias amostras de carga viral conhecida. Além disso, a técnica “nested” RT-PCR em tempo real demonstrou sensibilidade analítica de 96 cópias de RNA/mL e alta correlação com o teste Amplicor Monitor (“Roche Diagnostic Systems”) realizado tanto no procedimento padrão ($R^2=0,880$) como ultra-sensível ($R^2=0,859$). Portanto, a técnica de “nested” RT-PCR em tempo real desenvolvida e avaliada consiste em uma opção para o monitoramento da carga do HIV-1 durante todo o período da infecção e tratamento com anti-retrovirais de pacientes portadores.

Palavras Chave: HIV-1 – PCR em tempo real – Quantificação viral.

ABSTRACT:

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a pandemic infected-contagious disease caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). Approximately 33.2 millions people are infected with HIV in the world, most of them with HIV type 1 (HIV-1). Serial measurements of HIV-1 viral load in combination with CD4⁺ T-cell counts are the main markers for monitoring the infection progression and antiretroviral treatment. The great majority of the available commercial HIV-1 quantitation assays are nucleic acids based techniques. This study describes the evaluation of a real time nested RT-PCR assay to HIV-1 quantitation. The results demonstrated that the assay presented high specificity and a strong linear relationship ($R^2 = 0.943$) between the C_T values and the number of HIV-1 RNA copies/mL in plasma. The limit of detection of the assay was 96 copies/mL. Moreover, the HIV-1 RNA values obtained by real-time nested RT-PCR assay were highly correlated with those obtained by the Amplicor Monitor (Roche Diagnostic Systems), standard and ultrasensitive methods ($R^2 = 0.880$ e 0.859 , respectively). The real-time nested RT-PCR assay evaluated is an efficient option for monitoring viral load throughout the course of HIV infection and during antiretroviral therapy.

Keywords: HIV-1 – Real Time PCR – Viral quantitation.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença infecto-contagiosa pandêmica, cujo agente etiológico causador é o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Esse vírus causa uma progressiva depleção e um desequilíbrio no sistema imunológico, promovendo uma debilitação do corpo humano, que fica suscetível a neoplasias e infecções oportunistas (ESSEX *et al.*, 1997).

Atualmente, o HIV infecta aproximadamente 33,2 milhões de pessoas no mundo, sendo 30,8 milhões de adultos e 2,5 milhões de crianças e adolescentes com idade inferior a 15 anos. Em 2007, ocorreram aproximadamente 2,5 milhões de novas infecções e 2,1 milhões de infectados vieram ao óbito devido à AIDS. Na América Latina, existem aproximadamente 1,6 milhões de pacientes HIV positivo, cerca de 100 mil novas infecções ocorrem por ano e 58 mil portadores vieram ao óbito devido à AIDS no ano passado (UNAIDS, 2008).

1. Histórico

A partir dos anos 60, foram registrados em diferentes locais do mundo diversos casos de doenças oportunistas em humanos sem causa aparente. Mais tarde foi apontado que o principal motivo do desenvolvimento dessas doenças era a depleção de células T CD4⁺, que provocava uma deterioração do sistema imunológico. Esse quadro clínico foi bem caracterizado em pacientes homossexuais norte-americanos no ano de 1981, sendo então denominado de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês “Acquired ImmunoDeficiency Syndrome”). Mais tarde identificaram-se quadros clínicos semelhantes em usuários de drogas injetáveis, hemofílicos e casais heterossexuais, revelando que a transmissão do agente infeccioso ocorria pelo sangue contaminado e pela relação sexual. Posteriormente, evidenciou-se que a infecção por esse agente infeccioso também era transmitida de mãe para filho através da placenta, parto e amamentação. Devido à similaridade de transmissão com os patógenos da Hepatite B (HBV) e principalmente dos vírus que possuem tropismo pelos Linfócitos T (HTLV-I e II), intensificou-se a investigação de um vírus como provável causador da AIDS (ESSEX *et al.*, 1997).

Em 1983, anticorpos contra retrovírus foram identificados em amostras sanguíneas de pacientes com AIDS por ensaios de neutralização. Esse procedimento foi posteriormente estabelecido como o teste da AIDS, patenteado pelo “United States Department of Health and Human Service” (ESSEX *et al.*, 1997). Nesse mesmo ano, o agente causal, um retrovírus, foi descoberto e caracterizado por pesquisadores americanos e franceses, concomitantemente (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983; GALLO *et al.*, 1983). Em 1984, o vírus foi definitivamente associado à AIDS e nomeado pelo Comitê Internacional de Retropatologistas como Vírus da Imunodeficiência Humana, ou simplesmente HIV (ESSEX *et al.*, 1997).

Ao evidenciar que a doença evoluía diferentemente em algumas pessoas, isolados virais foram caracterizados e então classificados em 2 tipos: 1 e 2 (ESSEX *et al.*, 1997). Com o passar dos anos, ficou bem estabelecido que o HIV-1 é o agente etiológico mais patogênico e disseminado mundialmente, enquanto o HIV-2 é menos patogênico (os sintomas são mais brandos) e apresenta uma disseminação bem menor (está restrito principalmente ao Continente Africano, com raros casos em outros locais) (ROBERTSON *et al.*, 2008). O fato de outros primatas apresentarem uma doença semelhante (Síndrome da Imunodeficiência Símio), também causada por um retrovírus (SIV, do inglês “Simian Immunodeficiency Virus”), contribuiu para o início de pesquisas que estabeleceram que o HIV surgiu em primatas como os chimpanzés e posteriormente foi transmitido aos humanos (GAO *et al.*, 1999).

Em 1987 foi descrita a primeira droga anti-retroviral: a zidovudina, popularmente conhecida como AZT (YARCHOAN & BRODER, 1987), a qual passou a ser difundida principalmente nos países desenvolvidos. Em 1996 entrou em pauta o tratamento de pacientes infectados pelo HIV baseado na administração de múltiplas drogas anti-retrovirais, sendo denominado terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART, do inglês “Highly Active AntiRetroviral Therapy”). Este tipo de tratamento permitiu uma eficiência maior no tratamento de pacientes HIV-1 positivos (MO *et al.*, 1996). Em 1997, o Brasil foi o primeiro país a disponibilizar o tratamento com anti-retrovirais no Sistema Público de Saúde (UNAIDS, 2007a). Em 1998, outros países subdesenvolvidos passaram a se unir para disponibilizar esses medicamentos de forma gratuita principalmente na África (KATZENSTEIN *et al.*, 2003).

Atualmente, os principais enfoques das pesquisas sob o HIV estão relacionados a vacinas e monitoramento de pacientes infectados. As pesquisas referentes à vacina anti-HIV não têm tido muito êxito, devido à grande diversidade genética viral (CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2007). Por outro lado, diversas classes de medicamentos anti-retrovirais que prolongam a sobrevida dos infectados têm sido desenvolvidas (COHEN, 2006). Essa área farmacológica, por sua vez, abriu outras linhas de pesquisas, como a de desenvolvimento de técnicas para o monitoramento de infectados antes ou durante o tratamento com os anti-retrovirais (ROUET *et al.*, 2005; STEVENS *et al.*, 2005; DROSTEN *et al.*, 2006).

2. Descrição do Vírus

Taxonomicamente, o HIV pertence à família dos retrovírus e subfamília dos lentivírus. Por causa da alta capacidade de mutação e recombinação desse vírus, dois tipos principais (1 e 2) e vários grupos e subtipos foram identificados até o momento. O HIV-1 é o agente etiológico mais patogênico e disseminado mundialmente. Esse tipo classifica-se em grupo M (“Major”), O (“Outlier”) e N (“non-O” e “non-M”). O grupo M divide-se nos subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J e K (HIV DATABASE, 2008). Alguns desses subtipos recombinaram-se entre si formando variações genéticas como as formas recombinantes circulantes (CRF, do inglês “Circulating Recombinant Forms”) e formas recombinantes únicas (URF, do inglês “Unique Recombinant Forms”). Até 2005 já existiam 32 diferentes CRFs como o CRF01/AE, CRF02/AG, CRF07/BC, CRF08/BC e CRF12/BF (LEITNER *et al.*, 2007). O HIV tipo 2 (HIV-2) demonstra uma patogenia de menor intensidade que o HIV-1 e apresenta disseminação bastante restrita aos países do Continente Africano, sendo raros os casos descritos no Brasil (ESSEX *et al.*, 1997; FUSUMA *et al.*, 2005; KANDATHIL *et al.*, 2005; HIV DATABASE, 2008). O HIV-2 não será abordado no presente trabalho.

O HIV-1 apresenta forma esférica de aproximadamente 100nm de diâmetro e constitui-se de um núcleo (“core”) estabilizado por uma estrutura protéica chamada de capsídeo. Esse, por sua vez, ancora-se em proteínas estruturais da matriz, a qual está envolvida por um envelope externo. No núcleo estão presentes o material genético, Transcriptase Reversa (RT) e Integrase. O material genético é constituído por duas fitas de RNA com aproximadamente 9,2 Kb. Os genes estruturais são: *gag* – codificador das

proteínas do nucleocapsídeo, capsídeo e matriz, *pol* – codificador das enzimas de replicação transcriptase reversa, integrase e protease, e *env* - codificador das glicoproteínas externas. Os outros genes virais são os regulatórios: *tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu* e *vpr*, que contribuem para a estrutura, expressão gênica e infecciosidade viral (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; MEISSNER & COFFIN, 2002).

O capsídeo e a matriz do HIV-1 são formados principalmente por proteínas p24 e, p17 e p18, respectivamente. Enquanto que o envelope é formado pela bicamada fosfolipídica (oriunda da membrana celular do hospedeiro) com a inserção de glicoproteínas, entre elas, a gp120 e gp41 (Figura 1) (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; MEISSNER & COFFIN, 2002; GRIFFITH *et al.*, 2007).

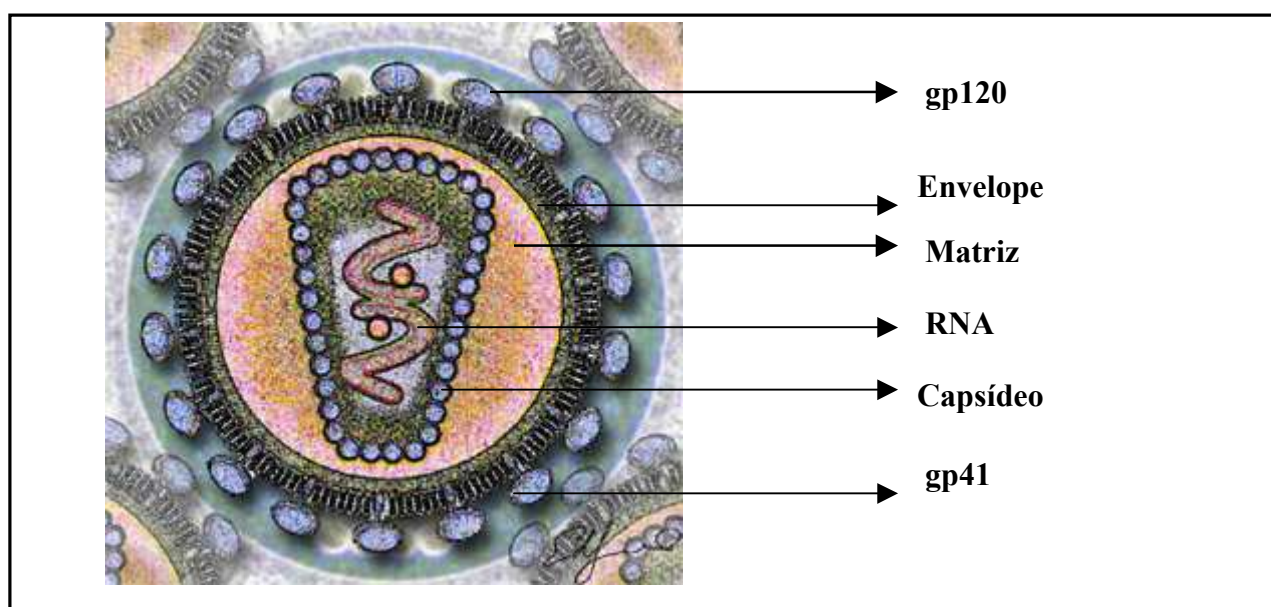


Figura 1: Estrutura Molecular do HIV-1 (adaptado de LOS ALAMOS, 2008).

3. Epidemiologia

A partir do ano de 1981, quando foram relatados casos de imunodeficiência pelo HIV, os dados epidemiológicos demonstraram uma progressiva pandemia. Conforme destacado previamente, o HIV infecta aproximadamente 33,2 milhões de pessoas no mundo todo (UNAIDS, 2008). O Continente Africano, mais precisamente a região subsaariana, apresenta a maior prevalência de infecções, sendo que 15 a 34% dos adultos (variações conforme os países) estão infectados pelo HIV. O norte do Continente Asiático e grande parte do Continente Africano apresentam a segunda maior prevalência de

infectados, estima-se que em torno de 1 – 5% dos adultos sejam HIV positivos. Nos demais continentes a prevalência de HIV demonstra-se menos acentuada com estimativa de adultos infectados menor que 0,5% (Figura 2) (UNAIDS, 2007b).

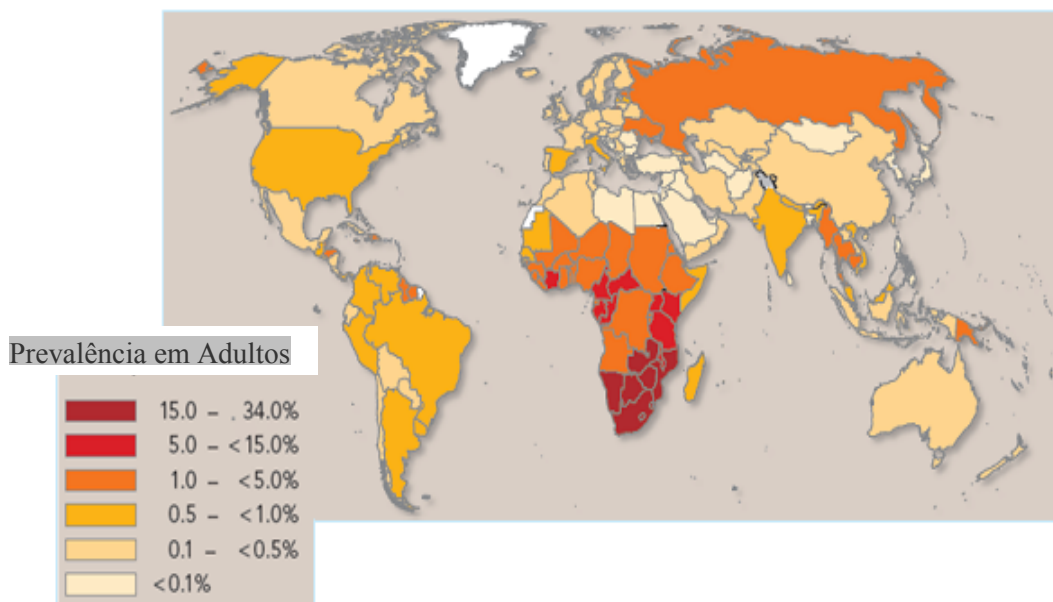


Figura 2: Visão global da prevalência de infecções pelo HIV no ano de 2005 (adaptado de UNAIDS, 2007b).

Na América Latina, estima-se a ocorrência de 1,6 milhões de infecções pelo HIV. Só no ano de 2007, ocorreram aproximadamente 100 mil novas infecções (UNAIDS, 2008). No Brasil, segundo dados de 2005, a estimativa de pacientes HIV positivos é de 620 mil, o que representa mais de um terço das infecções existentes na América Latina (UNAIDS, 2008).

O grupo M do HIV-1 apresenta maior disseminação mundial. Dentre seus subtipos, A, B e C apresentam maior distribuição geográfica, sendo que o B disseminou-se mais entre os países desenvolvidos (PERRIN *et al.*, 2003). Os outros subtipos, no entanto, apresentam disseminação crescente. Uma pesquisa recente realizada no Reino Unido mostrou alta prevalência de subtipos não-B entre homossexuais (TATT *et al.*, 2004). Na França, os subtipos não-B representam cerca de 45% das infecções diagnosticadas recentemente (LOT *et al.*, 2004). Esse aumento, também é evidenciado na América do Norte: segundo Akouamba *et al.* (2005), 42,7% das mulheres infectadas pelo HIV-1 que visitaram a clínica pré-natal de Montreal apresentavam a infecção por subtipos não-B. Já

os grupos O e N do HIV-1 apresentam maior prevalência na África. Nos demais continentes esses grupos ainda estão pouco distribuídos (KANDATHIL *et al.*, 2005).

No Sul da América Latina e no Brasil os subtipos do HIV-1 grupo M mais disseminados são o B, C e F, além da forma recombinante CRF12/BF (BONGERTZ *et al.*, 2000; BRINDEIRO *et al.*, 2003; COELHO, 2007). Pesquisas realizadas no Brasil identificaram casos de infecções por um subtipo B variante e outras formas recombinantes (DE SÁ FILHO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Segundo Brindeiro *et al.* (2003), o subtipo C é predominante, em uma proporção de 30%, no sul do Brasil, enquanto o B predomina no norte, em uma proporção de aproximadamente 86% e o F predomina no centro-norte em uma proporção aproximada de 22% e, ainda, os subtipos recombinantes predominam no Brasil em uma proporção de 14,5%.

4. Transmissão

A principal forma de transmissão do HIV-1 é pela relação sexual, principalmente devido ao contato da mucosa genital ou anal com sangue, sêmen ou secreção vaginal contaminados. Outras formas importantes de transmissão são: transplante de órgãos, transfusão de sangue ou derivados e compartilhamento de materiais contaminados (como agulhas e seringas) (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; MEISSNER & COFFIN, 2002; GRIFFTH *et al.*, 2007).

O HIV-1 também pode ser transmitido pela via perinatal, que ocorre durante o parto ou amamentação, ou por via transplacentária. Entretanto, com a administração de anti-retrovirais durante a gestação e a restrição à amamentação, a probabilidade de transmissão do HIV-1 para neonatos foi drasticamente reduzida (MEISSNER & COFFIN, 2002; GRIFFTH *et al.*, 2007).

5. Replicação viral

Após a presença do HIV-1 no corpo humano, mais precisamente na circulação sanguínea e linfática, as partículas virais, através da gp120 do envelope, ligam-se aos receptores das células mononucleadas, como por exemplo: as dos monócitos, linfócitos B / T e células dendríticas. Os principais receptores celulares são denominados CD4⁺, que quando ligados ao gp120 dão o seguimento à ligação de co-receptores e ao ancoramento da gp41 viral sobre a célula (CLAPHAM & MCKNIGHT, 2002; GRIFFTH *et al.*, 2007).

Essas ligações e ancoramento permitem que o envelope do vírus se insira na membrana celular, liberando o “core” no citoplasma, local onde as duas fitas de RNA são transcritas reversamente a DNA pela ação da transcriptase reversa. Uma vez formadas as fitas de DNA proviral, as mesmas juntamente com a Integrase são transportadas para o núcleo através dos poros da membrana nuclear. Dentro do núcleo, a Integrase rompe o cromossomo hospedeiro e juntamente com proteínas celulares, faz a inserção do provírus ao DNA celular (ESSEX *et al.*, 1997; MEISSNER & COFFIN, 2002).

A inserção do provírus no cromossomo humano faz com que esse material genético passe a ser funcional como qualquer outro gene humano: ocorre estimulação, replicação, transcrição e tradução dos materiais virais. A estimulação é gerada pela ação de sinalizadores virais e celulares que acionam as regiões terminais longas e repetidas (LTRs, do inglês “Long Terminal Repeat regions”). As regiões LTRs estimuladas permitem a ação de uma DNA polimerase no provírus que transcreve os genes *nef*, *tat* e *rev* por “splicings” alternativos (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; GRIFFTH *et al.*, 2007). As proteínas Tat produzidas estimulam a transcrição de outras proteínas virais, também por “splicings” alternativos, enquanto que as proteínas Rev permitem o transporte dos RNAs do núcleo para o citoplasma. Dessa maneira, são produzidos o RNA genômico e o RNA que será traduzido nas proteínas estruturais da partícula viral (ESSEX *et al.*, 1997). As partículas virais (virions) são então montados na membrana celular e liberados por brotamento. Cada virion formado deixa a célula que o originou e passa ao meio extracelular pronto para infectar uma nova célula (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; POLLARD & MALLIN, 1998; GRIFFTH *et al.*, 2007).

Em alguns casos, a célula ao tornar-se infectada pelo HIV-1 não necessariamente gera transcrição de imediato. A célula infectada pode entrar em um período de latência, transcrevendo virions mais tardiamente (MEISSNER & COFFIN, 2002).

6. Patogenicidade e Fases da Infecção

A patogenicidade do HIV-1 é extremamente complexa. Após a transmissão, as partículas virais infectam de forma persistente as células mononucleares, preferencialmente as células T do hospedeiro para multiplicar-se de forma lenta. Esta inserção viral nas células de defesa celular humana causa uma progressiva deterioração e um desequilíbrio do sistema imunológico. Tais acometimentos proporcionam o desenvolvimento de infecções,

neoplasias e manifestações clínicas características de imunodeficiência. A infecção pelo HIV-1 pode ser dividida em quatro fases clínicas: infecção aguda ou primária, assintomática ou latência clínica, sintomática inicial ou precoce e AIDS (MEISSNER & COFFIN, 2002).

Durante a infecção aguda, que ocorre logo após a contaminação, aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem sintomatologia em menos de 4 semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2006b). Os sinais e sintomas clínicos, no entanto, são inespecíficos, como os de uma infecção viral comum. Nessa fase, há uma resposta imunológica intensa com alta replicação, disseminação e localização viral principalmente nos tecidos linfóides. Além disso, há queda dos níveis de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e início gradual da produção de anticorpos, o que dificulta a detecção do vírus por testes sorológicos nessa fase clínica (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2006b).

Com a consolidação da resposta imunológica e alta produção de anticorpos contra o vírus, inicia-se a fase assintomática, na qual a carga viral plasmática baixa consideravelmente e os níveis de células T CD4⁺ e T CD8⁺ aumentam. Contudo, essas células não retornam aos níveis prévios à infecção, pois praticamente toda a quantidade liberada na corrente sanguínea é destruída devido à replicação viral ou pela ação das células T CD8⁺ (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; MEISSNER & COFFIN, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2006b).

A fase de latência viral pode durar anos, mas com o passar do tempo, o sistema imunológico sofre uma constante deterioração: a produção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ torna-se cada vez menor em proporção ao aumento da carga viral (Figura 3). Esse acometimento imunológico aumenta progressivamente até que os níveis de células T CD4⁺ tornem-se muito baixos, caracterizando o início da fase sintomática (NADLER *et al.*, 1996; ESSEX *et al.*, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2006b).

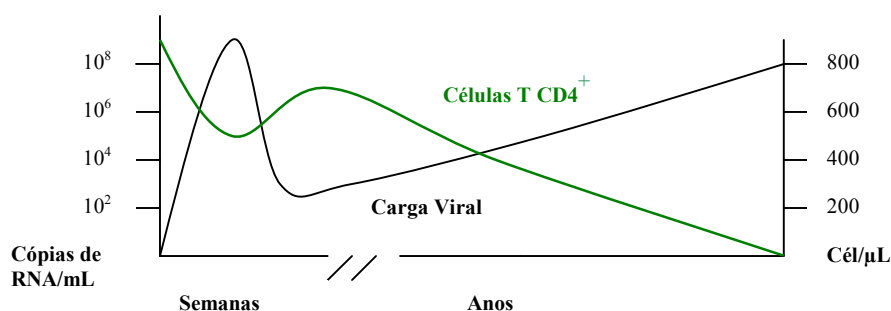


Figura 3: Relação inversa dos níveis de células T CD4⁺ com a carga viral na progressão da infecção pelo HIV-1.

Assim, o acometimento do sistema imunológico da fase sintomática é inicialmente caracterizado por sinais e sintomas de intensidade variável e menos específicos e, infecções oportunistas de menor gravidade. Dentre os sinais, sintomas e doenças infecciosas mais relatadas em pacientes nessa fase clínica, destacam-se: sudorese noturna, febre, emagrecimento, leucoplasia pilosa oral e diarreias provocadas por bactérias, vírus e protozoários (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2006b).

A AIDS é a última fase clínica. Segundo o Ministério da Saúde (2008c), um indivíduo adulto é considerado aidético quando apresenta doenças oportunistas ou neoplasias características de deficiência imunológica, como citomegalovirose, micobacteriose, candidíase, criptococose, criptosporidiose, sarcoma de Kaposi e linfomas não-Hodgkin e/ou níveis de células T CD4⁺ inferior à 350/μL. Nessa fase clínica há elevado risco de o paciente vir ao óbito.

A carga viral e o nível de células T CD4⁺ estão diretamente relacionados com a progressão da infecção pelo HIV-1. Segundo BACCHETTI *et al.* (1989), após a soroconversão o tempo médio para o desenvolvimento da AIDS é de 10 anos. Todavia, quanto maior a carga viral e menor o nível de células T CD4⁺, maior será o risco de desenvolver AIDS em 6 meses (Tabela 1) (PHILLIPS, 2004).

Tabela 1: Risco preditivo de 6 meses para o desenvolvimento da AIDS de acordo com a idade, nível de células T CD4⁺ e carga viral, baseado no Modelo de Regressão de Poisson (adaptado de PHILLIPS, 2004).

Risco preditivo (%) de acordo com os níveis de células T CD4 ⁺ (células/ μ L)											
Idade	Carga viral (cópias de RNA/mL)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
25 anos	3.000	6.8	3.7	2.3	1.6	1.1	0.8	0.6	0.5	0.4	0.3
	10.000	9.6	5.3	3.4	2.3	1.6	1.2	0.9	0.7	0.5	0.4
	30.000	13.3	7.4	4.7	3.2	2.2	1.6	1.2	0.9	0.7	0.6
	100.000	18.6	10.6	6.7	4.6	3.2	2.4	1.8	1.4	1.1	0.8
	300.000	25.1	14.5	9.3	6.3	4.5	3.3	2.5	1.9	1.5	1.2
35 anos	3.000	8.5	4.7	3.0	2.0	1.4	1.0	0.8	0.6	0.5	0.4
	10.000	12.1	6.7	4.3	2.9	2.0	1.5	1.1	0.9	0.7	0.5
	30.000	16.6	9.3	5.9	4.0	2.8	2.1	1.6	1.2	0.9	0.7
	100.000	23.1	13.2	8.5	5.8	4.1	3.0	2.3	1.7	1.3	1.1
	300.000	30.8	18.0	11.7	8.0	5.7	4.2	3.1	2.4	1.9	1.5
45 anos	3.000	10.7	5.9	3.7	2.5	1.8	1.3	1.0	0.7	0.6	0.5
	10.000	15.1	8.5	5.4	3.6	2.6	1.9	1.4	1.1	0.8	0.7
	30.000	20.6	11.7	7.5	5.1	3.6	2.6	2.0	1.5	1.2	0.9
	100.000	28.4	16.5	10.6	7.3	5.2	3.8	2.9	2.2	1.7	1.3
	300.000	37.4	22.4	14.6	10.1	7.2	5.3	4.0	3.1	2.4	1.9
55 anos	3.000	13.4	7.5	4.7	3.2	2.3	1.7	1.2	0.9	0.7	0.6
	10.000	18.8	10.7	6.8	4.6	3.3	2.4	1.8	1.4	1.1	0.8
	30.000	25.4	14.6	9.4	6.4	4.6	3.3	2.5	1.9	1.5	1.2
	100.000	34.6	20.5	13.3	9.2	6.5	4.8	3.6	2.8	2.2	1.7
	300.000	44.8	27.5	18.2	12.6	9.1	6.7	5.0	3.9	3.0	2.4

Distinção do risco conforme o sombreado: < 2%, sem sombra; 2 - 9,9%, sombra cinza claro; 10 - 19,9%, sombra cinza médio; > 20%, sombra cinza escuro

7. Tratamento

Atualmente, pacientes infectados pelo HIV-1 podem ser tratados mediante drogas chamadas de anti-retrovirais, as quais são utilizadas para impedir ou diminuir a replicação viral e, dessa forma, prolongar a sobrevida dos infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b).

As drogas anti-retrovirais causam um rompimento ou inibição de alguma fase durante o período de replicação, reduzindo ou bloqueando o sucesso da produção de

virions infecciosos (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b). Existem quatro classes de drogas anti-retrovirais aprovadas pela Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA do inglês, “Food and Drug Administration”) para terapia em pacientes HIV-1 positivos: inibidores de transcrição reversa análogos de nucleosídeos, inibidores de transcrição reversa não análogos de nucleosídeos, inibidores de protease e inibidores de fusão (GRIFFITH *et al.*, 2007). Segundo o Ministério da Saúde – Brasil, 2007b), os protocolos de tratamento mais utilizados no Brasil são compostos de associações entre as 3 primeiras classes de anti-retrovirais apresentadas anteriormente.

Conforme Hammer *et al.* (2006), a Sociedade Internacional da AIDS dos EUA (International AIDS Society-USA) recomenda iniciar o tratamento com anti-retrovirais em adultos quando o número de células T CD4⁺ estiver abaixo de 350/μL. Contudo, esse critério está sendo revisado. Segundo Palella *et al.* (2003), o tratamento com anti-retrovirais iniciado quando os níveis de células T CD4⁺ estão entre 201 e 350/μL reduz o risco do paciente vir ao óbito. Ademais, o tratamento iniciado antes dos níveis de células T CD4⁺ chegar a 350/μL pode trazer benefícios para a sobrevivência dos infectados. Em oposição, Phillips *et al.* (2001), não relata benefícios aos pacientes que iniciam o tratamento com anti-retrovirais quando os níveis de células T CD4⁺ encontram-se superior à 350/μL, mas destaca que a eficiência do início do tratamento pode ser menor em pacientes com carga viral acima de 100.000 cópias de RNA/mL.

No Brasil, o início do tratamento com anti-retrovirais é recomendado em adultos ou adolescentes sintomáticos ou em assintomáticos que estejam com os níveis de células T CD4⁺ entre 200 – 350 /μL, especialmente quando a carga viral estiver acima de 100.000 cópias/mL (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b). Em gestantes infectadas pelo HIV-1 assintomáticas, caso o nível de células T CD4⁺ esteja acima de 200 células/μL recomenda-se iniciar tratamento com anti-retrovirais após a 14^a semana de gestação. Entretanto, para as pacientes sintomáticas ou assintomáticas com níveis de células T CD4⁺ abaixo de 200/μL o tratamento com anti-retrovirais deve ser iniciado de imediato (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008f). Já para crianças recém nascidas, filhas de mães infectadas pelo HIV-1, é recomendado o tratamento com zidovudina durante os primeiros 42 dias de vida e, caso confirme-se que a criança esteja infectada pelo vírus, recomenda-se iniciar tratamento com anti-retrovirais levando em conta os níveis de células

T CD4⁺, carga viral (valores estabelecidos conforme a faixa etária) e a presença de sinais e sintomas característicos de imunodeficiência.

Conforme as recomendações da Sociedade Internacional da AIDS dos EUA (International AIDS Society-USA), após iniciar o tratamento a carga viral deve ser determinada a cada 3 - 4 meses (HAMMER *et al.*, 2006). No Brasil, as recomendações de monitoramento de adultos e adolescentes HIV-1 positivos são similares às recomendações da “Internatinal AIDS Society-USA” (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b). Em crianças, a quantificação viral e a verificação dos níveis de células T CD4⁺ devem ser monitoradas periodicamente, assim como em pacientes adultos. Porém, a interpretação dos resultados laboratoriais depende da idade da criança (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008d). Já em gestantes, o Ministério da Saúde – Brasil (2008f), recomenda a quantificação viral desde a primeira consulta gestacional e repetida entre a 24^a e 28^a e na 34^a semanas de gestação, pois cargas virais baixas durante essa fase diminuem as chances de transmissão do HIV-1 por via vertical e de progressão da infecção em neonatos (KOWALSKA *et al.*, 2003; IOANNIDIS *et al.*, 2004).

De acordo com Rizzardi *et al.* (2000), o tratamento com anti-retrovirais geralmente proporciona queda na carga viral, atingindo níveis abaixo de 50 cópias de RNA/mL em um período de 16 – 24 semanas de tratamento. Em relação à interpretação da carga viral como um marcador de eficiência terapêutica, variações nas quantificações do HIV-1 iguais ou abaixo de 0,5 log₁₀ cópias de RNA/mL não são consideradas significativas em adultos, pois são decorrentes de fatores intrínsecos das técnicas de quantificação viral utilizadas atualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2006b). Em crianças, é aceitável queda na carga viral de 1 log₁₀ cópias de RNA/mL após 8 – 12 semanas de tratamento, mesmo que, em alguns casos, a quantidade de HIV-1 não se mantenha abaixo de 50 cópias de RNA/mL (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008d).

Por outro lado, caso haja falha terapêutica caracterizada pelo aumento da carga viral e redução dos níveis de células T CD4⁺, é indicada a realização da genotipagem viral para investigação de resistência ao tratamento. Posteriormente, deve-se iniciar um esquema de tratamento resgate com diferentes drogas anti-retrovirais que sejam compatíveis com o genótipo do HIV-1. Além disso, recomenda-se a quantificação viral após 1 - 2 meses do início da nova terapia (HAMMER *et al.*, 2006).

Segundo Gallant (2007), considera-se falha terapêutica em adultos quando a carga viral encontra-se acima de 400 cópias de RNA/mL após 24 semanas de tratamento ou acima de 50 cópias de RNA/mL após 48 semanas de tratamento ou, ainda, para pacientes que atingiram supressão viral completa e por efeito rebote apresentam carga viral acima de 400 cópias/mL. Em crianças, considera-se falha virológica, carga viral acima da variação permitida para a idade: acima de 0,7 log₁₀ cópias de RNA/mL para crianças menores de 2 anos e acima de 0,5 log₁₀ cópias de RNA/mL para maiores de 2 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008d).

8. Diagnóstico

O diagnóstico do HIV-1 pode ser dividido em 2 níveis principais: (i) detecção, utilizada para verificar ou confirmar a infecção pelo vírus, e (ii) quantificação, de suma importância para o monitoramento de pacientes infectados antes ou durante o tratamento com anti-retrovirais (FEARON, 2005). Em situações de resistência à medicação, a avaliação da suscetibilidade aos antivirais, por métodos fenotípicos ou genotípicos, também pode ser realizada na rotina diagnóstica (GRIFFITH *et al.* 2007).

8.1. Detecção

A detecção da infecção pelo HIV-1 pode ser realizada tanto por metodologias sorológicas, que detectam anticorpos contra o HIV-1 ou antígenos virais presentes no plasma ou no soro, ou por metodologias moleculares, que detectam a presença do ácido nucléico viral presente em diversos tipos de amostras biológicas (GRIFFITH *et al.*, 2007). As principais técnicas sorológicas são: imunoensaio enzimático, imunofluorescência indireta, imunoblot, western-blot e testes rápidos. Dentre as técnicas de imunoensaio enzimático, destaca-se o ensaio enzimático imunoabsorvente (ELISA do inglês, “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). Esta técnica já está na 4^a geração, sendo capaz de reagir tanto com os anticorpos como com os antígenos do HIV-1 e, com isso, reduzir o período de janela imunológica (SPEERS *et al.*, 2005).

Segundo o Ministério da Saúde – Brasil (2007a), a detecção de infecção pelo HIV-1 em amostras de pacientes com idade acima de 18 meses deve ser realizada a partir de metodologias sorológicas, utilizando três etapas. A primeira delas, chamada de triagem, deve ser realizada por técnicas de imunoensaio enzimático. Se o resultado for não-

reagente, a amostra é interpretada como negativa para HIV-1, mas se for reagente ou indeterminado, deve-se realizar os procedimentos de confirmação. Estes, por sua vez, são divididos em duas etapas. A primeira constituída por um novo teste de imunoensaio enzimático (aplicando-se um Kit diferente do utilizado na triagem), mais imunofluorescência ou imunoblot. Se os dois resultados forem negativos a amostra é interpretada como negativa para HIV-1, se forem positivos a mesma é interpretada como positiva para HIV-1, mas se os resultados forem contraditórios, ou seja, um resultado positivo ou indeterminado e outro negativo, deve-se proceder a etapa seguinte da confirmação, na qual processa-se a amostra por Western-blot. Caso o resultado seja positivo, a amostra é interpretada como positiva para o HIV-1, mas se o resultado for indeterminado ou negativo, deve-se considerar o período de soroconversão. Todos os resultados relatados como positivos para HIV-1 na etapa de confirmação, deve ser novamente confirmado na etapa de triagem através de uma nova amostra coletada em um intervalo de até 30 dias.

Recentemente, foi regulamentada no Brasil a utilização de testes rápidos para diagnóstico de HIV-1 em amostras de pacientes com idade acima de 18 meses. Segundo Ferreira Junior *et al.* (2005), os testes rápidos oferecem rapidez, simplicidade e performance comparáveis aos testes de imunoensaio enzimático. A detecção de infecção pelo vírus deve ser realizada pelo processamento das amostras em dois testes rápidos paralelamente, caso os dois forem positivos, a amostra é liberada como infectada pelo HIV-1, caso sejam negativos, a amostra é liberada como não infectada pelo HIV-1, mas se os resultados forem discordantes, deve-se testá-la novamente por outro teste rápido. O programa de saúde pública (Sistema Único de Saúde – SUS) do Brasil regulamentou o uso desses testes apenas para locais de difícil acesso ou em caso de mulheres em trabalho de parto ou pós-parto, as quais não fizeram acompanhamento médico durante a gestação (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b).

De acordo com o Ministério da Saúde – Brasil (2008d), a detecção de infecção pelo HIV em crianças de até 18 meses filhas de mães HIV-1 positivas deve ser realizada a partir de testes baseados na detecção de ácidos nucleicos (RNA ou DNA viral). A detecção ocorre da seguinte forma: deve-se realizar um primeiro teste, caso a carga viral seja detectada, repete-se o teste novamente no mês seguinte, se a carga viral for novamente detectada, a criança é HIV-1 positiva. Entretanto, caso a carga viral seja indetectada no

primeiro teste, repete-se a quantificação novamente após dois meses. Se detectada, repete-se a quantificação com nova amostra, mas se indetectada a criança deve ser submetida a testes sorológicos após no mínimo 1 ano de idade para a confirmar a não infecção pelo HIV-1.

As técnicas moleculares possibilitam a detecção do HIV-1 durante o período inicial da infecção aguda, ou seja durante o período de janela imunológica (JORDAN, 2000). Segundo Fiebig *et al.*, 2003, as técnicas moleculares que apresentam sensibilidade analítica de 50 cópias de RNA/mL detectam a infecção pelo HIV aproximadamente 7 dias antes da detecção por técnicas relacionadas aos anticorpos e antígenos p24. A detecção precoce do HIV-1 permite um acompanhamento prévio ao aparecimento de sintomas, possibilitando maior qualidade de vida aos infectados. Além disso, diminui as chances de transmissão viral para pacientes não infectados, como por exemplo, em centros de transfusão sanguínea (GENDLER & PASCUCIO, 2007)

8.2 Quantificação

A quantificação viral, juntamente com a verificação dos níveis de células T CD4⁺ são parâmetros essenciais para avaliar a progressão da doença e o monitoramento da eficiência do tratamento com anti-retrovirais (MELLORS *et al.*, 1997; MYLONAKIS *et al.*, 2001). Segundo o “Working Group of Office of Aids Research Advisory Council” (OARAC) (2007), pacientes HIV-1 positivos que não estejam em tratamento com anti-retrovirais, os níveis de células T CD4⁺ devem ser verificados de 3 a 6 meses e a quantificação viral realizada a cada 3 ou 4 meses. No Brasil, no entanto, a periodicidade de quantificação viral em adultos e adolescentes infectados que não estejam em tratamento, deve ser realizada na descoberta da infecção pelo HIV-1 e após o nível de células T CD4⁺ aproximar-se de 350/ μ L (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b).

A quantificação do HIV-1 pode ser realizada por técnicas desenvolvidas a partir da análise (1) dos ácidos nucleicos, ou (2) do antígeno p24 ou (3) da atividade da transcriptase reversa (RT). As mais utilizadas são as baseadas em ácidos nucleicos, pois são descritas há mais tempo, aprovadas pelo FDA e recomendadas por protocolos nacionais e internacionais (WORKING GROUP OF OFFICE OF AIDS RESEARCH ADVISORY COUNCIL (OARAC), 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b; 2008d). Dentre elas, destacam-se: a RT-PCR, bDNA, NASBA e RT-PCR em tempo real.

A Reação em Cadeia da Polimerase (ou simplesmente PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”) foi a primeira técnica baseada em ácidos nucleicos descrita para a quantificação viral (KELLOGG *et al.*, 1990). A partir dela, foram desenvolvidos os kits comerciais atualmente mais utilizados, ou seja, o “Amplicor HIV-1 MonitorTM versão 1.5” (Amplicor Monitor) e o “Cobas Amplicor HIV-1 MonitorTM versão 1.5” (Cobas Amplicor). Ambos kits possibilitam o processamento pelos métodos padrão e ultra-sensível e são comercializados pela empresa “Roche Diagnostic Systems”. Outro Kit comercial baseado em PCR é o “LCxTM HIV-1 RNA Quantitative assay” (LCx) comercializado pela empresa “Abbott Molecular”.

Os 2 testes da Roche amplificam e detectam a região viral *gag* p24. O método padrão utiliza 0,2 mL de amostra plasmática e apresenta linearidade de 400 – 750.000 cópias de RNA/mL. Já no método ultra-sensível utiliza-se 0,5 mL de amostra plasmática, que previamente passa por um processo de centrifugação, e apresenta linearidade de 50 – 100.000 cópias de RNA/mL (ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEMS, 2008). O teste da Abbott amplifica e detecta a região viral *pol*, apresentando a linearidade de 50 – 5.000.000 cópias de RNA/mL e utilizando 0,2 a 1 mL de amostra plasmática (DE MENDOZA *et al.*, 2002).

A técnica de bDNA (DNA ramificado, do inglês “branched DNA”) é comercializada pela empresa “Bayer Diagnostics”, com o nome “VersantTM HIV-1 RNA versão 3.0” (Versant). Esse teste detecta a região *pol* do HIV-1 e necessita de 1mL de amostra plasmática. A linearidade da versão do teste comercializado nos EUA é 75 – 500.000 cópias de RNA/mL e da versão comercializada na União Européia é 50-500.000 cópias de RNA/mL (SIEMENS, 2007).

Já a NASBA (Amplificação Baseada na Sequência de Ácidos Nucleicos, do inglês “Nucleic Acid Sequence-Based Amplification”) é comercializada pela empresa “Biomérieux” pelo nome “NucliSensTM HIV-1 RNA QT” (NucliSens), o qual utiliza 1 mL de plasma, apresenta linearidade de 51 – 5.390.000 cópias de RNA/mL e anela-se a região *gag* p24 do HIV-1 (BIOMÉRIEUX, 2007).

Várias publicações têm demonstrado que os testes acima: Cobas Amplicor e Amplicor Monitor, inclusive os métodos padrão e ultrasensível, LCx, Versant e NucliSens são reprodutíveis, sensíveis e específicos. Ademais, apresentam grande correlação nas quantificações de HIV-1 grupo M subtipo B, não-B e recombinantes (NOLTE *et al.*, 1998;

SUN *et al.*, 1998; ERAI & HILLYARD, 1999; MURPHY *et al.*, 2000; SWANSON *et al.*, 2000; AMENDOLA *et al.*, 2004; BERGER *et al.*, 2005; GALLI *et al.*, 2005; SWANSON *et al.*, 2005).

Todavia, os testes comerciais apresentam desvantagens como alto custo e tecnologia complexa (FISCUS *et al.*, 2006). Em virtude disso, foram desenvolvidas outras técnicas. Uma delas baseada na quantificação de antígenos virais p24, comercializado pela empresa “Perkin-Elmer” pelo nome de “HiSens™ HIV-1 p24 Ag Ultra assay” (p24 Ag) e a outra baseada na atividade da RT, comercializada pela empresa “Cavidi Tech AB” pelo nome de “ExaVir™ Load Quantitative HIV-RT” (atividade de RT). A quantificação viral pelos Kits baseados nas técnicas p24 Ag e Atividade de RT são formas alternativas para monitorar pacientes HIV-1 positivos, porém, ambos apresentam baixa sensibilidade analítica em relação à quantificação obtida por técnicas moleculares. Adicionalmente, a técnica p24 Ag apresenta baixa correlação com as técnicas baseadas em ácidos nucleicos e a Atividade de RT necessita de 2 a 3 dias para ser realizada (BONARD *et al.*, 2003, BRAUN *et al.*, 2003; PRADO *et al.*, 2004; JENNINGS *et al.*, 2005; STEVENS *et al.*, 2005). Isso, por sua vez, dificulta o uso mais intensivo no monitoramento de pacientes em tratamento com anti-retrovirais. Segundo Jennings *et al.*, 2005, o baixo custo é o único benefício oferecido pelos kits baseados na Atividade de RT e p24 Ag.

A PCR em tempo real tem sido descrita como uma técnica de grande impacto para os laboratórios, pois oferece como vantagens praticidade, eliminação da detecção pós-PCR, redução do tempo de manipulação do laboratorista, acompanhamento da amplificação e rapidez na liberação dos resultados (JORDAN, 2000; DOMIATI-SAAD & SCHEUERMENN, 2006; GUNSON *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado o uso da técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção e quantificação do HIV-1 em várias amostras biológicas, como o plasma, líquido, secreções cérvico-vaginais, sêmen e células sanguíneas mononucleadas (DÉSIRÉ *et al.*, 2001; KLEIN *et al.*, 2003; VITONE *et al.*, 2004; LEGOFF *et al.*, 2006; PASQUIER *et al.*, 2006; KAMAT *et al.*, 2007). Nestas últimas, tem-se viabilizado a quantificação do provírus, ou seja, o DNA viral, inserido ou não nos cromossomos hospedeiros. De acordo com Désiré *et al.* (2001) e Vitone *et al.* (2004), não há relação significativa entre o valor de provírus/10⁶ células mononucleares em sangue periférico e carga viral. No entanto, o provírus é um fator que pode auxiliar na investigação de progressão viral, principalmente nos casos de tratamento com anti-

retrovirais em que a carga viral permanece por algum tempo abaixo do limite de detecção de técnicas moleculares. Em relação à quantificação do HIV-1 plasmático, diversos protocolos baseados em RT-PCR em tempo real têm sido propostos (PALMER *et al.*, 2003; GIBELLINI *et al.*, 2004; ROUET *et al.*, 2005; DROSTEN *et al.*, 2006; KAMAT *et al.*, 2007; MÜLLER *et al.*, 2007; REKHVIASHVILI *et al.*, 2007; SCHVACHSA *et al.*, 2007). Técnicas de PCR em tempo real “in house” têm sido utilizadas em locais de poucos recursos financeiros, oferecendo custos mais baixos do que a utilização de kits comerciais (KLEIN *et al.*, 2003; ROUET *et al.*, 2005). Além disso, já estão disponíveis no mercado 2 kits comerciais: um da “Roche Diagnostic Systems” chamado de “Cobas Taqman™ HIV-1” (Cobas Taqman) e outro da “Abbott Laboratories” chamado de “RealTime™ HIV-1 assay” (RealTime), os quais amplificam e detectam a região p24 *gag* e *pol* do HIV-1, respectivamente (GARCIA-DIAZ *et al.*, 2006; KATSOULIDOU *et al.*, 2006; PERRIN *et al.*, 2006; GUEUDIN *et al.*, 2007; SCHUMACHER *et al.*, 2007; SWANSON *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2007).

As diversas publicações de PCR em tempo real para quantificar o HIV-1 plasmático demonstram que a técnica apresenta: especificidade e sensibilidade para quantificar os diferentes subtipos e recombinantes do HIV-1 grupo M e, reprodutibilidade tanto em intercorridas como intracorridas (ROUET *et al.*, 2005; SWANSON *et al.*, 2006a; SWANSON *et al.*, 2006b), linearidade até 1,0 milhão de cópias de RNA/mL (PALMER *et al.*, 2003) e sensibilidade analítica de 50 cópias de RNA/mL (GIBELLINI *et al.*, 2004). Tais dados são similares ou superiores as das outras técnicas moleculares. Além disso, apresenta excelente correlação e concordância com os demais testes comerciais. Segundo, trabalho realizado por Drosten *et al.* (2006), a técnica de PCR em tempo real obteve coeficiente de correlação médio de 0,9 quando comparada aos testes Amplicor Monitor, Versant e NucliSens.

OBJETIVOS

- (1) Avaliar a performance analítica da técnica de “nested” RT-PCR em tempo real para quantificação do HIV-1 RNA.
- (2) Realizar análise comparativa com o teste comercial Amplicor HIV-1 Monitor v1.5.

CAPÍTULO 2

A dissertação propõe a avaliação da técnica “nested” RT-PCR em tempo real para quantificação de HIV-1 e comparação com o teste “Amplicor HIV-1 MonitorTM” versão 1.5 (“Roche Diagnostic Systems”). As metodologias empregadas e os resultados dos experimentos estão descritos no manuscrito “**Evaluation of a real-time nested RT-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)**” a ser enviado para publicação na revista Memórias do Instituto Osvaldo Cruz.

Running title: Real-time nested RT-PCR assay for HIV-1 quantitation

Evaluation of a real-time nested RT-PCR assay for quantitation of human
immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)

Ticiani, R*/**, Ikuta, N*/***, Fonseca, ASK***, Lunge, VR */***.

*Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil ** Curso de Biomedicina, Laboratório de Análises Clínicas, Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, Brazil *** Simbios Biotecnologia, Canoas, Brazil.

Corresponding author:

Vagner Ricardo Lunge:

Simbios Biotecnologia

Universidade Luterana do Brasil

Av. Farroupilha, 8001 – Prédio 22 – 3^o andar

92425-9000 Canoas, RS, Brazil

Tel.: + 55 5134782777

e-mail: lunge@simbios.com.br

Summary

The determination of the viral load is highly recommended for monitoring disease progression and response to antiretroviral therapy (ART) in HIV-1 positive patients. Quantitative testing of HIV-1 is usually done by nucleic acids based assays. However the available commercial assays are too expensive for developing countries where a large number of patients are treated by the public health programs. In this study, an “in-house” real-time nested RT-PCR assay for HIV-1 viral load testing was evaluated. Reproducibility was assessed using 7 plasma samples tested in 33 independent runs. Analytical sensitivity of 96 RNA copies/mL was defined using 7-fold serial dilution of plasma samples with known quantities (Probit regression analysis). Specificity was demonstrated using 50 HIV-1 seronegative plasma specimens, all of them with negative results. A group of 76 HIV-1 positive samples was used to assess the correlation between the real-time nested RT-PCR assay and the Amplicor Monitor Kit. An overall intra class correlation coefficient of 0.880 and 0.859 (CI 95%) was obtained between real-time nested RT-PCR and Amplicor Monitor standard and ultrasensitive methods, respectively. Thus this assay compares well to Amplicor Monitor HIV-1 and represents an affordable alternative for sensitive HIV-1 load testing in resource limited settings.

Keywords: HIV-1 quantitation – real-time nested RT-PCR – plasma samples.

Introduction:

Brazil has one of the worst AIDS epidemics in the Latin American with an estimated 620,000 people living with HIV in the country in 2005 (UNAIDS 2007). The incidence rate of new registered AIDS cases is around 10.1 in 100,000 people in 2006 (MS 2007a). A national antiretroviral treatment (ART) roll-out program is implemented in Brazil since 1997 (UNAIDS 2006) and currently approximately 180,000 HIV positive patients in the public sector are receiving Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) (MS 2005).

The determination of CD4⁺ T-cell count and HIV-1 load in plasma are useful to evaluate disease progression and essential to monitor the efficacy of HAART (Mellors et al. 1997, Mylonakis et al. 2001). The Brazilian National Antiretroviral Treatment Guideline recommends the determination of CD4⁺ T-cell counts and viral load assays each 3 – 4 months for monitoring the efficacy of HAART (MS 2007b).

Available technology for quantitative evaluation of HIV-1 includes at least 3 nucleic acid based methodologies: competitive Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), branched DNA (bDNA) and Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) (Collins et al. 1997, Johanson et al. 2001, Kievits et al. 1991, Sun et al. 1998). These methods are currently applied in standard commercial kits (COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor, v 1.5 - Roche Diagnostics Systems, VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay - Bayer Diagnostics and NucliSens HIV-1 QT – Biomeri  ux, respectively) employed for sensitive and specific routine HIV-1 infection monitoring in clinical laboratories. However, these assays are still too expensive for routine diagnostics in the public sector in Brazil and represent an annual cost of at least US\$ 8 million (MS 2004).

Some alternative tests were developed in the last decade, including Reverse Transcriptase assay (Exa Vir Load assay; Caviidi Tech AB, Uppsala, Sweden) and HIV p24 Antigen (Perkin-Elmer, Wellesly, Mass), but these assays have lower analytical sensitivity than the nucleic acid-based assays (Braun et al. 2003, Jennings et al. 2005, Stevens et al. 2005).

Recently, real-time PCR has emerged as a new diagnostic route for the sensitive, specific and quantitative management of HIV. Real-time RT-PCR assays have been developed to detect and quantify HIV DNA or RNA in laboratorial routine (Désiré et al. 2001, Drosten et al. 2006, Rekhviashvili et al. 2007, Rouet et al. 2005, Vitone et al. 2004). This paper describes the evaluation of a real-time nested RT-PCR assay for sensitive detection and quantitation of HIV-1 RNA in plasma using ABI Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems). The assay uses TaqmanTM probes and HIV-1 *gag* p24 region for RNA amplification and detection target.

Materials and Methods:

Panel, Samples and Standards. Studies were approved by the Committee of Ethics and Research of the University (ULBRA).

A panel of samples was prepared by pooling plasma with low, medium and high viral loads. The panel was composed by 7 different pools with increasing HIV-1 concentrations (342, 1,203, 1,701, 2,544, 20,400, 103,521 and 182,782 RNA copies/mL). The viral load of them was assessed by Amplicor Monitor performed in 3 replicates. This panel was used in the reproducibility study and as external standards and controls in the real-time nested RT-PCR assay.

One plasma sample previously sent by a proficiency program (Control-Lab, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), with a pre-defined viral load of 1,050 copies/mL, was used for the sensitivity study.

The 50 HIV-1 negative human plasma samples used for the specificity study and the 84 HIV-1 positive human plasma samples used for the correlation study were provided by a clinical laboratory (Simbios Biotecnologia, Canoas, RS, Brazil). HIV-1 viral load in these patients was routinely tested using the standard HIV-1 Amplicor Monitor.

RNA extraction. In all plasma samples, RNA was extracted using the NewGene kit of reagents (Simbios Biotecnologia, Canoas, RS, Brazil) that is based on the method described by Boom et al. (1990). Briefly, 150 µL of plasma sample was added to 1,350 µL of lyse mix in a micro-tube and maintained for 10 min at room temperature. After, 20 µL of silica particles suspension was added to each microtube, vortexed 2-fold and centrifuged at 30 s for 10,000 rpm. The pellet was washed as follow: (i) twice using 1.0 mL of washing solution and centrifugation at 10,000 rpm for 30 s, (ii) twice using 1.0 mL of 75% ethanol and centrifugation at 10,000 rpm for 30 s, (iii) once using 1.0 mL of acetone and centrifugation at 10,000 rpm for 30 s. The supernatant was removed and the pellet was dried at 60°C for 15 min. The RNA was eluted with 50µL of elution buffer and incubated at 65°C for 5 min. The solution containing the RNA was separated of the silica particles centrifuging at 3 min for 10,000 rpm.

Real-time nested RT-PCR assay. Reverse transcription and the first-round of PCR amplification was performed in a 100 µl reaction volume using 78.6 µl of a mastermix solution (final concentration of 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT, 1 mM dNTPs and 2.0 µM of the primers 5' - AGT GGG RGG ACA YCA RGC AGC - 3' and 5' TGT CAT CCA TSC TAT TTG YTC 3'), 20 U of MMLV-RT (Invitrogen,

USA), 8 U RnaseOut (Invitrogen, USA), 1.5 U Taq DNA polymerase (Cenbiot Enzimas, RS, Brazil) and 20 µl of extracted RNA. The reverse transcription was carried out at 37°C for 30 min followed by the first round of PCR amplification for 20 cycles with temperatures and times of 94°C for 20 s, 55°C for 40 s and 72°C for 60 s. A final extension step of 72°C for 7 min was also included. A real-time nested PCR (second round of amplification) was performed in a 30 µl reaction volume using 27.6 µl of a mastermix solution (final concentration of 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT, 1 mM dNTPs, 1.5 U Taq DNA polymerase (Cenbiot Enzimas, RS, Brazil), 0.5 µM of the 4 primers 5'- ATC AAG CAG CCA TGC AAA TGT T -3', 5'- ACC AGG CAG CTA TGC AAA TGT T -3', 5'- TGA AGG GTA CTA GTA GTT CCT GCT ATG TC -3' and 5'- CTG AAG GGT ACT AGT AGT TCC TGC TAT ATC -3', 0,25 µM of the probe 5' - (FAM) ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GA (MGB) - 3'). The PCR amplification was run for 45 cycles with 2 temperatures and times: 94°C for 20 s and 60°C for 60 s.

Five external standards (calibrators) and 2 plasma controls were included in each real-time nested RT-PCR run in order to import the best suitable standard curve into the run. Concentrations of standards were entered into the software in RNA copies/mL and thus HIV-1 viral load values for the plasma samples were obtained in the same units.

HIV-1 viral load using Amplicor Monitor assay (Amplicor Monitor). HIV-1 viral load in all plasma samples was quantified using the Amplicor HIV-1 MonitorTM Test, version 1.5 assay (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA). This assay applies RT-PCR technology targeting the *gag* p24 region of HIV-1, manual extraction of samples and offers two methods of processing: ultrasensitive and standard. The ultrasensitive method uses 500µL of plasma sample and have a linear dynamic extension

range of 50-100,000 ($1.7-5.0 \log_{10}$) RNA copies/mL. The standard method uses 200 μ L of plasma sample and have a linear dynamic extension range of 400-750,000 ($2.6-5.87 \log_{10}$) RNA copies/mL.

Statistical analysis. Seven plasma samples with viral load 342 to 182,782 (2.53 to $5.26 \log_{10}$) RNA copies/mL were tested in 33 independent runs to assess the reproducibility of the real-time nested RT-PCR and determine the correlation coefficient. A sample set in a proficiency program (Control-Lab, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) with 1,050 HIV-1 RNA copies/mL and more 7 serial two-fold dilution (525, 263, 131, 66, 33, 16 and 8 RNA copies/mL) and Probit regression analysis were used to determine the analytical sensitivity of the assay. Simple correlation coefficients were calculated to determine the relationship between the HIV-1 RNA levels of the samples obtained with Amplicor Monitor and real-time nested RT-PCR.

Results:

Reproducibility

To assess the reproducibility, the 7 plasma samples of the panel were tested in 33 independent runs, totaling up 231 runs. The inter-assay reproducibility of the standard curve was determined (Figure 1). In all cases, there was an excellent correlation between the threshold cycle (C_T) and $\log_{10}$ of the number of HIV-1 RNA copies/mL. The mean correlation coefficient was 0.943 (range, 0.80 to 0.99, $p < 0.05$). The mean slope was -4.03 (CI 95%, range, -3.01 to -5.11).

Determination of the detection threshold (Analytical sensitivity)

The limit of detection was determined by using a panel consisted of a sample used in 8 serial twofold dilutions in a negative human plasma sample. Plasma containing each

concentration was extracted in 3 parallel RNA preparations, and each of these was tested in 3 replicates by real-time nested RT-PCR assays, totaling 9 data points per concentration. No dropout in HIV-1 detection in 9 parallel reactions was observed from 131 RNA copies/mL upward. We performed Probit regression analysis to determine the projected response rates according to a dose–response model (Tabela 1). At viral load of 96 ($1.98 \log_{10}$) RNA copies/mL, detection probability was 95% or higher (CI 95%, 71-186 RNA copies/mL).

Specificity

Specificity was evaluated using 50 plasma samples that were negative with the Amplicor Monitor. The real-time nested RT-PCR assay did not detect HIV-1 RNA in any of these samples.

Comparative analyses of Real-time nested RT-PCR with Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5.

The comparison of Real-time nested RT-PCR assay with Amplicor Monitor was performed using a total of 84 positive samples from HIV-1 infected patients (35 processed by Amplicor Monitor standard method and 49 by ultrasensitive method).

Of the 35 samples processed by the Amplicor Monitor standard method and Real-time nested RT-PCR assay, 4 presented results below the limit of detection for both methods (400 RNA copies/mL for Amplicor Monitor and 96 RNA copies/mL for the Real-time nested RT-PCR). One sample presented a result below the limit for Amplicor Monitor and above the limit for Real-time nested RT-PCR (viral load: 301 or $2.5 \log_{10}$ RNA copies/mL). The correlation coefficient (R^2) obtained among the remaining 30 samples was 0.880 ($p < 0.05$) (Figure 2a). In the comparison between the absolute values of each sample, it was not observed any difference $> 1.0 \log_{10}$ RNA copies/mL. The mean

difference of viral load obtained with Real-time nested RT-PCR assay and Amplicor Monitor standard method was $-0.28 \log_{10}$ (mean values, $3.99 \log_{10}$ and $4.27 \log_{10}$, respectively).

Of the 49 samples processed by Amplicor Monitor ultrasensitive method and Real-time nested RT-PCR assay, one presented positive results below the limit of detection in both methods (50 RNA copies/mL for Amplicor Monitor and 96 RNA copies/mL for Real-time nested RT-PCR) and 2 presented results below the limit for Real-time nested RT-PCR and above the limit for Amplicor Monitor (viral load: $109 - 2.0 \log_{10}$ and $258 - 2.4 \log_{10}$ – RNA copies/mL). The comparison of the others 46 samples showed a correlation coefficient (R^2) of 0.859 (Figure 2b). Two of these samples presented a difference of $> 1.0 \log_{10}$ RNA copies/mL (5.5 and $5.5 \log_{10}$ for Amplicor Monitor X 6.6 and $6.7 \log_{10}$ for Real-time nested RT-PCR). The mean difference of viral load obtained with Real-time nested RT-PCR and Amplicor Monitor ultrasensitive method was $0.15 \log_{10}$ (mean values, $4.07 \log_{10}$ and $3.92 \log_{10}$, respectively).

Discussion:

The determination of viral load and $CD4^+$ T-cell count in plasma are the main markers to monitor disease progression and response to HAART in HIV-1 positive patients (Mellors et al. 1997, Mylonakis et al. 2001). Brazil has about 620,000 HIV-1 infected persons and offers HAART (and the necessary laboratory assays to evaluate the response) to 180,000 patients in a public health program. Consequently, the introduction of assays with a good analytical performance, high throughput and mainly low-cost will surely bring benefits for this program.

Several recent studies have demonstrated the development and use of real-time PCR assays for the quantitation of HIV-1. A brief literature review revealed that 2 systems were already used: the ABI Prism Sequence Detection System from Applied Biosystems (Drosten et al. 2006, Müller et al. 2007, Palmer et al. 2003, Rouet et al. 2005) and the LightCycler® real-time PCR system from Roche Applied Sciences (Gibellini et al. 2004; Rekhviashvili et al. 2007). Among the assays, two detect the HIV-1 groups M, N and O (Drosten et al., 2006, Müller et al. 2007), other quantify low HIV-1 RNA concentrations processing more quantity of plasma samples (Palmer et al., 2003). The assay developed by Gibellini et al. (2004) target the HIV-1 *gag* region and uses SYBR green detection format. The assay described by Rouet et al., 2005, targeted the HIV-1 *gag* region and demonstrated a high correlation between HIV-1 RNA $\log_{10}$ copies/mL and C_T , but presented a lower sensitivity (300 copies/mL) than other assays. Our study aimed to describe and evaluate an in-house real-time nested RT-PCR assay on the Applied Biosystem Platform that has a good performance, with a high analytical sensitivity without using a higher volume of sample.

A good analytical performance is an important factor for a reliable quantitation of plasma HIV-1. The standard curve determined by the reproducibility of the 7 samples tested in 33 independent runs showed an excellent correlation coefficient between $\log_{10}$ RNA copies/mL and C_T ($R^2 = 0.94$) with a mean slope of -4.03 . The results of the real time nested RT-PCR assay are similar to other studies. Rouet et al. (2005) tested standards in 25 runs and the mean correlation coefficient was 0.99 with a mean slope of -3.38 . Müller et al. (2007) using results of 6 plasma samples tested in inter-assay runs, obtained the mean correlation coefficient of 0.99 with a mean slope of -3.42 .

The proposed methodology presented a very good analytical sensitivity, as the detection limit was assessed at 96 HIV-1 RNA copies/mL (95% probability). Commercial RT-PCR kits or other in-house quantitative assays presented similar sensitivities (Erali & Hillyard, 1999, Gibellini et al. 2004, Perrin et al. 2006, Schumacher et al. 2007). Some of the real-time quantitative studies for viral load detection presented lower sensitivities than our technique (Kamat et al. 2007, Rouet et al. 2005). However, one study using improved nucleic acid isolation and purification techniques, larger plasma sample volumes (up to 7 mL) and a real-time PCR method was able to detect and quantify HIV-1 RNA in plasma down to 1 copy/mL (Palmer et al. 2003). Other studies have also demonstrated an improvement of the sensitivity using larger plasma sample volumes. Gibellini et al. (2004) described a quantification HIV-1 assay based on SYBR green real-time RT-PCR with capacity to quantify viral load at 50 RNA copies/mL using 1 mL of plasma sample. Schumacher et al. (2007), using 850 μ L of plasma sample in a fully automated quantification (AmpliPrep/COBASTM TaqManTM system – Roche Diagnostic Systems), obtained analytical sensitivity of 40 RNA copies/mL. Tang et al. (2007) presented analytical sensitivities of 25 RNA copies/mL, 39 RNA copies/mL, 65 RNA copies/mL and 119 RNA copies/mL using 1 mL, 600 μ L, 500 μ L and 200 μ L of plasma sample, respectively. The plasma sample volume used in all assays of our study was 150 μ L. Further studies with larger plasma volume samples should be conducted to increase the sensitivity of the real-time nested RT-PCR assay.

In the specificity study, all the 50 HIV-1 negative samples tested showed results over the lower analytical sensitivity of the assay. Real-time nested RT-PCR had high specificity as presented by other real-time PCR assays described in other studies (Gibellini

et al., 2004, Palmer et al., 2003, Perrin et al., 2006, Rekhviashhvili et al. 2007, Rouet et al., 2005, Schumacher et al., 2007, Tang et al., 2007).

In this study, 76 HIV-1 detected samples were used to compare the performance of real-time nested RT-PCR assay with Amplicor Monitor. The correlation coefficients obtained in the comparison of the assay to Amplicor Monitor, methods standard and ultrasensitive ($R^2 = 0.880$ and 0.859 , respectively) indicate that the Real-time nested RT-PCR was a reliable assay to quantify HIV-1. Rouet et al. (2005) comparing an in-house real-time PCR assay with the Amplicor Monitor, obtained a correlation coefficient of 0.856 using 97 plasma samples. Gueudin et al. (2007) using 88 plasma samples, compared the RealTime assay from Abbott Molecular with Cobas TaqMan assay (Roche Diagnostic Systems) and Cobas Amplicor Monitor (Roche Diagnostic Systems) and the correlation coefficients were 0.90 and 0.83 , respectively. Swanson et al. (2006) compared a real time assay to the Amplicor Monitor using 67 plasma samples and the correlation was 0.915 . Kamat (2007) compared an in-house real-time PCR assay to the Amplicor Monitor using only 28 plasma samples and the correlation coefficient was 0.885 .

To our knowledge, this is the first demonstration of a real-time RT-nested PCR to quantify HIV-1 plasma samples. Our results demonstrate that it is possible to perform a quantitative analysis with a nested PCR procedure, using a first round of usual RT-PCR amplification with a limited number of cycles and a second round of real-time PCR with a higher number of cycles. This real-time nested RT-PCR demonstrated sensitivity and specificity similar to other real-time methods. Furthermore, the correlation with the Amplicor Monitor HIV-1 assay was very good. This assay could be recommended to quantify HIV-1 RNA in plasma samples.

References

- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dilen PM, van der Noorda J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
- Braun J, Plantier JC, Hellot MF, Tuaillon E., Gueudin M., Damond F., Malmsten A, Corrigan GE, Simon F 2003. A new quantitative HIV load assay based on plasma virion reverse transcriptase activity for the different types, groups and subtypes. *AIDS* 17: 331–336.
- Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C, Horn T, Ahle D, Detmer J, Shen LP, Kolberg J, Bushnell S, Urdea MS , Ho DD 1997. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/mL. *Nucleic Acids Res* 25: 2979–2984.
- Désiré N, Dehée A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, Rozenbaum W, Nicolas JC 2001. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol* 39: 1303-1310.
- Drosten C, Panning M, Drexler JF, Hansel F, Pedroso C, Yeats J, de Souza Luna LK, Samuel M, Liedigk B, Lippert U, Stürmer M, Doerr HW, Brites C, Preiser W 2006. Ultrasensitive monitoring of HIV-1 viral load by a low-cost real-time reverse transcription-PCR assay with internal control for the 5' long terminal repeat domain. *Clin Chem* 52: 1258-1266.
- Erali M, Hillyard DR 1999. Evaluation of the Ultrasensitive Roche Amplicor HIV-1 Monitor Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 37: 792-795.

- Gibellini D, Vitone F, Gori E, La Placa M, Re MC 2004. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. *J Virol Methods* 115: 183–189.
- Gueudin M, Plantier JC, Lemée V, Schmitt MP, Chartier L, Bourlet T, Ruffault A, Damound F, Vray M, Simon F 2007. Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime Extraction-Quantification Systems for HIV-1 Subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44: 500-505.
- Jennings C, Fiscus SA, Crowe SM, Danilovic AD, Morack RJ, Scianna S, Cachafeiro A, Brambilla DJ, Schupbach J, Stevens W, Respass R, Varnier OE, Gary JE, Corrigan J, Gronowitz S, Ussery MA, Bremer, JW 2005. Comparison of Two Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA Surrogate Assays to the Standard HIV RNA Assay. *J Clin Microbiol* 43: 5950–5956.
- Johanson J, Abravaya K, Caminiti W, Erickson D, Flanders R, Leckie G, Marshall E, Mullen C, Ohhashi Y, Perry R, Ricci J, Salituro J, Smith A, Tang N, Vi M, Robinson J 2001. A new ultrasensitive assay for quantitation of HIV-1 RNA in plasma. *J Virol Methods* 95: 81–92
- Kamat A, Rovi V, Desai A, Satishchandra P, Satish KS, Borodowsky I, Subbakrisna DK, Kumar M 2007. Quantitation of HIV-1 RNA levels in plasma and CSF asymptomatic HIV-1 infected patients from South India using a TaqMan real time PCR assay. *J Clin Virol* 39: 9-15.
- Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukink R, Dircks M, Adriaanse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P 1991. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods* 35: 273–286.

- Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126: 946–954.
- MS - Ministério da Saúde. Brazil: A Sustentabilidade do Acesso Universal a Antirretrovirais no Brasil, 2005. Accessed in 2008 Jan 10. Programa Nacional de DST e Aids Available from: http://www.aids.gov.br/internas_materia.asp?cod_materia=1316&cod_secao=hopkins
- MS - Ministério da Saúde. Brazil: Boletim Epidemiológico AIDS DST, 2007a; [cited 2008 Jan 15]. Programa Nacional de DST e Aids. Available from: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>
- MS - Ministério da Saúde. Brazil: PORTARIA Nº 1.015/GM Em 27 de maio de 2004, 2004; [cited 2008 Jan 22]. Programa Nacional de DST e Aids. Available from: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-1015.htm>
- MS - Ministério da Saúde. Brazil: Recomendações para terapias com anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2007/2008. documento preliminar, 2007b; [cited 2007 Oct 29]. Programa Nacional de DST e Aids. Available from: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm>
- Müller J, Eis-Hübinger AM, Däumer M, Kaiser R, Rox JM, Gürtler L, Hanfland P, Pötsch B 2007. A novel internally controlled real-time reverse transcription-PCR assay for HIV-1 RNA targeting the pol integrase genomic region. *J Virol Methods* 142: 127-135.

- Mylonakis E, Paliou M, Kich JD 2001. Plasma viral load testing in the management of HIV-1 infection. *Am Fam Physician* 63: 483-490.
- Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, Dewar RL, Planta A, Liu S, Metcalf JA, Mellors JW, Coffin JM 2003. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 41: 4531-4536.
- Perrin L, Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Sarrazin C, Zeuzem S, Colucci G 2006. Multicenter performance evaluation of a new TaqMan PCR assay for monitoring human immunodeficiency virus RNA load. *J Clin Microbiol* 44: 4371-4375.
- Rekhviashvili N, Stevens W, Marinda E, Gonin R, Stevens G, McIntyre J, Wood R 2007. Clinical performance of an in-house real-time RT-PCR assay using a fluorogenic LUXTM primer for quantitation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *J Virol Methods* 146: 14-21.
- Rouet F, Ekouevi DK, Chaix ML, Burgard M, Inwoley A, Tony TD, Danel C, Anglaret X, Leory V, Msellati P, Dabis F, Rouzioux C 2005. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *J Clin Microbiol* 43: 2709-2717.
- Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babiak R 2007. Fully automated quantification of human Immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® system. *J Clin Virol* 38: 304-312.
- Stevens G, Rekhviashvili N, Scott LE, Gonin R, Stevens W 2005. Evaluation of two commercially available, inexpensive alternative assays used for assessing viral load in a

- cohort of human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients from South Africa. *J Clin Microbiol* 43: 857-861.
- Sun R, Ku J, Jayakar H, Kuo JC, Brambilla D, Herman S, Rosenstraus M, Spadaro J 1998. Ultrasensitive reverse transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 36: 2964–2969.
- Swanson P, Holzmayer V, Huang S, Hay P, Adebiyi A, Rice P, Abravaya K, Thamm S, Devare SG, Hackett J Jr. 2006. Performance of the automated Abbott RealTime HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from London: comparison to VERSANT HIV-1 RNA 3.0, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, and LCx HIV RNA Quantitative assays. *J Virol Methods* 137: 184-192.
- Tang N, Huang S, Salituro J, Mak WB, Cloherty G, Johanson J, Li YH, Schneider G, Robinson J, Hackett J Jr., Swanson P, Abravaya K 2007. A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. *J Virol Methods* 146: 236-245.
- UNAIDS. 2007 AIDS Epidemic Update, 2008; [cited 2008 jan 02]. Available from: <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/2007default.asp>
- UNAIDS. 25 years of Aids, 2006; [cited 2007 set 26]. 2006 Report on the global AIDS epidemic. Available from: http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2006/2006GlobalReport_FullPresentation_en.ppt
- Vitone F, Gibellini D, Schiavone P, Re MC 2004. Quantitative DNA proviral detection in HIV-1 patients treated with antiretroviral therapy. *J Clin Virol* 33: 194-200.

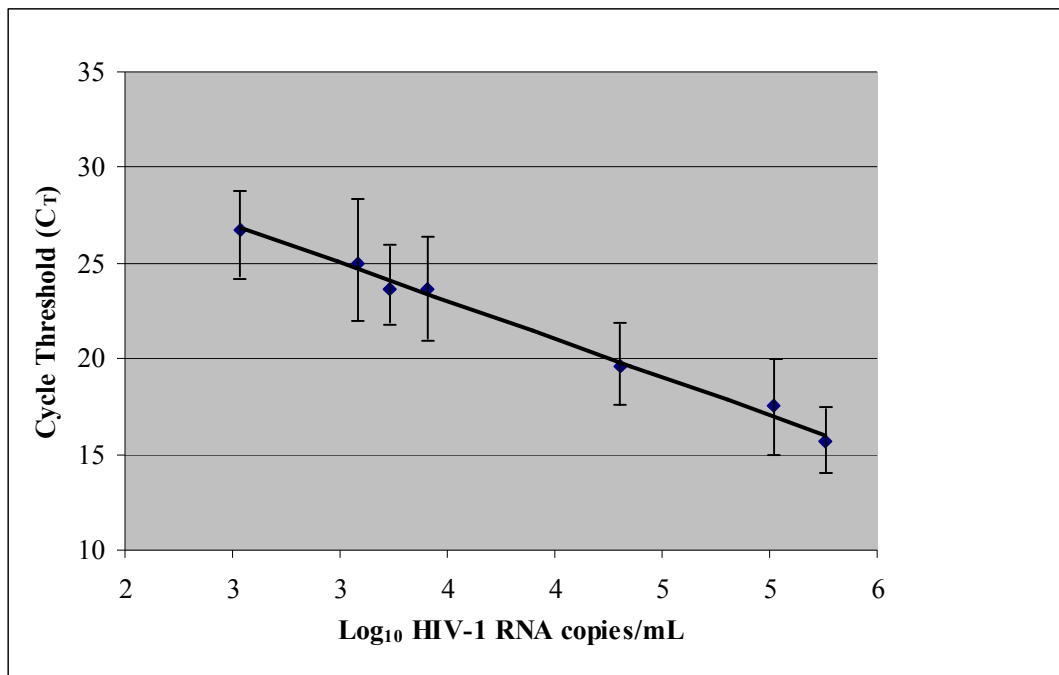
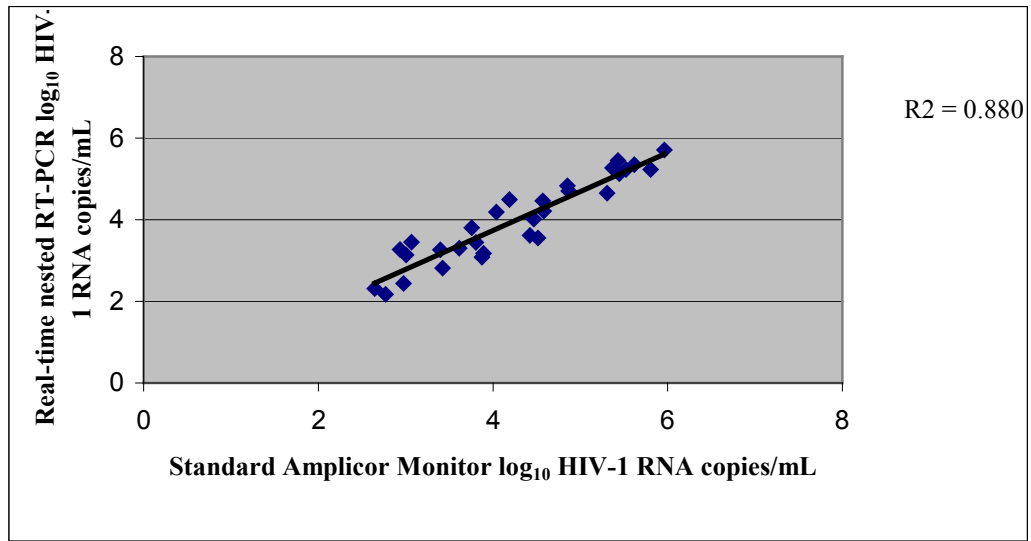


Fig. 1: Reproducibility assay of the real-time nested RT-PCR assay obtained by mean of 7 plasma sample tested in 33 independent runs.

Table 1. Analytical Sensitivity (95% CI) using PROBIT analysis

Titer (RNA - log ₁₀ - copies/mL)	Positivity rate (number positive/total)	% Positive	Analytical sensitivity
1,050 – 3.0	9/9	100.0	96 (1.98 log ₁₀) RNA copies/mL
525 – 2.7	9/9	100.0	
263 – 2.4	9/9	100.0	
131 – 2.1	9/9	100.0	
66 – 1.8	6/9	66.7	
33 – 1.5	4/9	44.4	
16 – 1.2	2/9	22.2	
8 – 0.9	0/9	0.0	

A



B

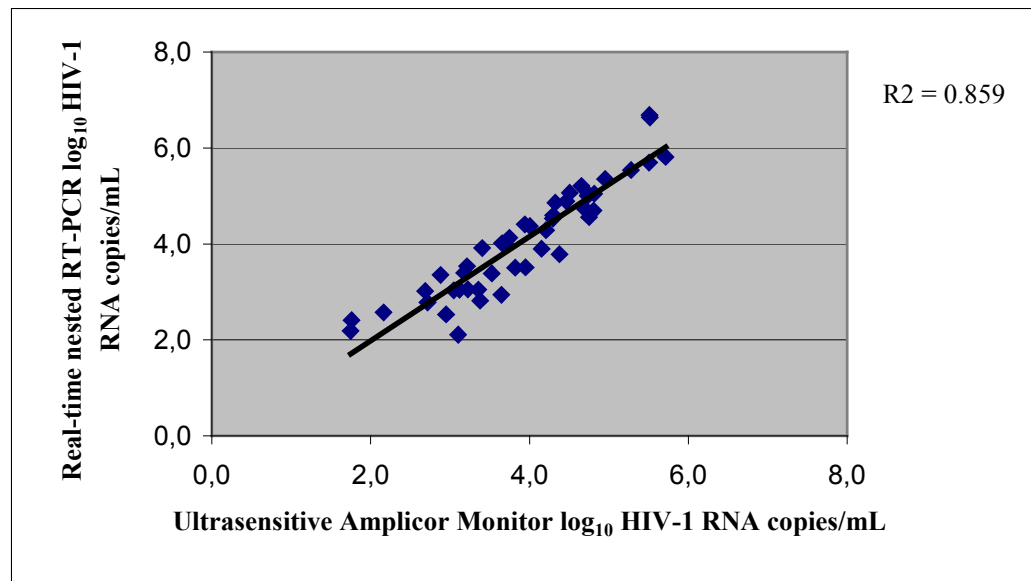


Fig. 2: Correlation between HIV-1 RNA viral load as measured with the Real-time nested RT-PCR and Amplicor Monitor standard method (30 plasma sample comparative measurements) (A) and ultrasensitive (46 plasma sample comparative measurements) (B).

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO

O Brasil apresenta cerca de 620 mil infectados pelo HIV, o que representa mais de 1/3 das infecções presentes na América Latina (UNAIDS, 2008). Além disso, disponibiliza o tratamento com anti-retrovirais para pacientes infectados pelo HIV-1 através do Sistema Único de Saúde. Em 2006, cerca de 180.000 infectados estavam inseridos nesse programa (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008a).

A verificação dos níveis de células T CD4⁺ e a quantificação do HIV-1 são ferramentas essenciais para o monitoramento de pacientes infectados pelo vírus seja para avaliar a progressão da doença ou para monitorar o tratamento com anti-retrovirais (MELLORS *et al.*, 1997; MYLONAKIS *et al.*, 2001). Ambas devem ser verificadas periodicamente em crianças, adolescentes, adultos e gestantes infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007b; 2008d; 2008f).

O número de técnicas empregadas na quantificação do HIV-1 é limitado. As mais utilizadas são as baseadas na avaliação de ácidos nucleicos: RT-PCR, b-DNA e NASBA, as quais foram padronizadas em kits comerciais pelas empresas “Roche Diagnostics Systems”, “Biomérieux”, “Abbott” e “Bayer Diagnostics”. Todavia, apresentam desvantagens como tecnologia complexa e custo elevado (FISCUS *et al.*, 2006). Em 2004, foram destinados cerca de R\$ 14 milhões em quantificações virais e R\$ 1 bilhão na compra de medicamentos anti-retrovirais para pacientes HIV-1 positivos incluídos no programa brasileiro de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008a; 2008e).

A necessidade de testes de baixo custo para a realização da quantificação viral tem sido discutida mundialmente. Diversas publicações têm focado o desenvolvimento de técnicas que apresentem um baixo custo e tecnologia pouco complexa para que possam ser utilizadas no monitoramento de pacientes infectados pelo HIV que residam em locais de poucos recursos e alta prevalência de infecções por esse vírus, como é o caso de vários países da África (BONARD *et al.*, 2003; ROUET *et al.*, 2005; STEVENS *et al.*, 2005; DROSTEN *et al.*, 2006).

O Brasil, juntamente com outros países em desenvolvimento, tem procurado estabelecer parcerias tecnológicas de incentivo ao desenvolvimento de anti-retrovirais,

preservativos, vacinas e testes laboratoriais com o objetivo de expandir o acesso ao diagnóstico, prevenção e tratamento do HIV-1. Todavia, para que estes produtos e testes sejam utilizados na prática clínica devem oferecer eficiência semelhante ou melhor em relação aos existentes, além de tecnologia acessível e baixo custo (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008g).

A PCR em tempo real vem sendo muito explorada na área da biologia molecular, pois oferece diversas vantagens, dentre elas, rapidez na liberação dos resultados, capacidade de processamento de várias amostras, eliminação da etapa de detecção do material amplificado e baixo custo (JORDAN, 2000; DOMIATI-SAAD & SCHEUERMENN, 2006; GUNSON *et al.*, 2006). Além disso, existem várias publicações a respeito da utilização da PCR em tempo real para a quantificação do HIV-1, sendo que grande parte delas demonstra performance muito boa e excelente correlação com testes comerciais existentes (GIBELLINI *et al.*, 2004; ROUET *et al.*, 2005; DROSTEN *et al.*, 2006; GARCIA-DIAZ *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2006; KATSOULIDOU *et al.*, 2006; PERRIN *et al.*, 2006; SCHVACHSA *et al.*, 2006; SWANSON *et al.*, 2006a, SWANSON *et al.*, 2006b; KAMAT *et al.*, 2007; MÜLLER *et al.*, 2007; REKHVIASHVILI *et al.*, 2007; SCHUMACHER *et al.*, 2007; SWANSON *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2007).

Este trabalho propôs a avaliação da “nested” RT-PCR em tempo real para quantificação do HIV-1 plasmático. Esta técnica utiliza sondas TaqManTM na região *gag* p24 para amplificação e detecção viral. Os resultados demonstraram que a técnica avaliada apresenta alta especificidade e excelente correlação entre a carga viral gerada em log₁₀ cópias de RNA/mL e número de C_T ($R^2 = 0,94$), cuja análise foi determinada a partir da reprodutibilidade de várias amostras em 33 corridas independentes. Além disso, houve alta correlação entre a “nested” RT-PCR em tempo real e o Amplicor Monitor métodos de processamento padrão e ultrasensível ($R^2 = 0.880$ e 0.859 , respectivamente). Cabe destacar que o Amplicor Monitor é o teste mais largamente utilizado nos laboratórios clínicos e aprovado pelas entidades reguladoras de vários países (incluindo o FDA norte-americano).

A técnica “nested” RT-PCR em tempo real tem uma sensibilidade analítica de 96 cópias de RNA/mL, bastante similar à obtida em vários outros trabalhos (KAMAT *et al.* 2007, ROUET *et al.* 2005, TANG *et al.* 2007, ERAI & HILLYARD, 1999, GIBELLINI *et al.* 2004, PALMER *et al.* 2003, PERRIN *et al.* 2006, SCHUMACHER *et al.* 2007). Esperava-se uma sensibilidade analítica ainda maior, pois procedimentos de “nested” RT-

PCR apresentam níveis de sensibilidade mais elevados. Contudo, para a extração de RNA foram utilizadas apenas 150µL de amostra plasmática, enquanto as técnicas moleculares comerciais utilizam volumes superiores a 200µL e/ou procedimentos de centrifugação de amostras previamente a extração do material genético (BIOMÉRIEUX, 2007; DE MENDOZA *et al.*, 2002; ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEMS, 2008; SIEMENS, 2007). Futuramente, para aumentar a sensibilidade do teste, podem ser realizados novos experimentos utilizando maior volume de amostras plasmáticas ou incluído um processo de centrifugação prévio à extração de ácidos nucleicos.

A técnica “nested” RT-PCR em tempo real avaliada no presente estudo demonstrou excelentes resultados na quantificação viral de pacientes HIV-1 positivos. A técnica pode ser utilizada com sucesso na avaliação da progressão da infecção viral e também no monitoramento da resposta a terapia com anti-retrovirais. Neste aspecto, apresenta-se como uma opção para a utilização na rotina de laboratórios clínicos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT MOLECULAR. RealTime HIV-1 assay. Disponível em: <http://www.abbottmolecular.com/> Acessado em: 15/01/2008.

AKOUAMBA, B.S., VIEL, J., CHAREST, H., MERINDOL, N., SAMSON, J., LAPOINTE, N., BRENNER, B.G., LALONDE, R., HARRIGAN, P.R., BOUCHER, M., SOUDEYNS, H. HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerg Infect Dis*, v. 11 (8), p. 1230-1234, 2005.

AMENDOLA, A., BORDI, L., ANGELETTI, C., GIRARDI, E., IPPOLITO, G., CAPOBIANCHI, M.R. Comparison of LCx with Other Current Viral Load Assays for Detecting and Quantifying Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Patients Infected with the Circulating Recombinant Form A/G (CRF02). *J Clin Microbiol*, v. 42 (2), p. 811–815, 2004.

BACCHETTI, P., MOSS, A.R. Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature*, v. 338 (6212), p. 251-253, 1989.

BARRÉ-SINOUSSE, F., CHERMANN, J.C., REY, F., NUGEYRE, M.T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VÉZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W., MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220 (4599), p. 868-871, 1983.

BERGER, A., SCHERZED, L., STURMER, M., PREISER, W., DOERR, H.W., RABENAU, H.F. Comparative evaluation of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test, the new Cobas AmpliPrep/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test and the Versant HIV RNA 3.0 assays for quantitation of HIV-1 RNA in plasma samples. *J Clin Virol*, v. 33 (1), p. 43-51, 2005.

BIOMÉRIEUX. NuclieSens HIV-1 QT. Disponível em: <http://biomerieux-usa.com/clinical/nucleicacid/assays.htm> Acessado em: 14/12/2007.

BONARD, D., ROUET, F., TONI, T.A., MINGA, A., HUET, C., EKOUÉVI, D.K., DABIS, F., SALAMON, R., ROUZIOUX, C. Field Evaluation of an Improved Assay Using a Heat-Dissociated p24 Antigen for Adults Mainly Infected With HIV-1 CRF02_AG Strains in Côte d'Ivoire, West Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 34 (3), p. 267–273, 2003.

BONGERTZ, V., BOU-HABIB, D.C., BRÍGIDO, L.F., CASEIRO, M., CHEQUER, P.J., **COUTO-FERNANDEZ, J.C.**, FERREIRA, P.C., GALVÃO-CASTRO, B., GRECO, D., GUIMARÃES, M.L., LINHARES DE CARVALHO M.I., MORGADO, M.G., OLIVEIRA, C.A., **OSMANOV, S.**, RAMOS, C.A., ROSSINI, M., SABINO, E., TANURI, A., UEDA, M. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 23 (2), p. 184–193, 2000.

BRAUN, J., PLANTIER, J.C., HELLOT, M.F., TUAILLON, E., GUEUDIN, M., DAMOND, F., MALMSTEN, A., CORRIGAN, G.E., SIMON, F. A new quantitative HIV load assay based on plasma virion reverse transcriptase activity for the different types, groups and subtypes. *AIDS*, v. 17 (3), p. 331–336, 2003.

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

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Vaccine Development. Disponível em: http://www.cdc.gov/hiv/topics/research/vaccine_unit/development.htm Acessado em: 29/10/2007.

CLAPHAM, P.R., MCKNIGHT, A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol*, v. 83 (8), p. 1809-1829, 2002

COELHO, S. Conhecimento dos subtipos de HIV que circulam no país pode ajudar na produção de vacinas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=410&sid=12> Acessado em: 23/10/2007.

COHEN, C.J. Successful HIV treatment: lessons learned. *J Manag Care Pharm*, 12 (7 B), p. S6-11, 2006.

DE MENDOZA, C., ALCAMÍ, J., SAINZ, M., FOLGUEIRA, D., SORIANO, V. Evaluation of the Abbott LCx quantitative assay for measurement of human immunodeficiency virus RNA in plasma. *J Clin Microbiol*, v. 40 (4), p.1518-1521, 2002.

DE SÁ FILHO, D.J., SUCUPIRA, M.C., CASEIRO, M.M., SABINO, E.C., DIAZ, R.S., JANINI, L.M. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 22 (1), p. 1-13, 2006.

DÉSIRÉ, N., DEHÉE, A., SCHNEIDER, V., JACOMET, C., GOJON, C., GIRARD, P.M., ROZENBAUM, W., NICOLAS, J.C. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*, v. 39 (4), p. 1303-1310, 2001.

DOMIATI-SAAD, R., SCHEUERMENN, R.H. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta*, v. 363 (1-2), p. 197-205, 2006.

DROSTEN, C., PANNING, M., DREXLER, J.F., HANSEL, F., PEDROSO, C., YEATS, J., DE SOUZA LUNA, L.K., SAMUEL, M., LIEDIGK, B., LIPPERT, U., STURMER, M., DOERR, H.W., BRITES, C., PREISER, W. Ultrasensitive monitoring of HIV-1 viral load by a low-cost real-time reverse transcription-PCR assay with internal control for the 5' long terminal repeat domain. *Clin Chem*, v. 52 (7), p. 1258-1266, 2006.

ERALL, M., HILLYARD, D.R. Evaluation of the Ultrasensitive Roche Amplicor HIV-1 Monitor Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clin Microbiol*, v. 37 (3), p. 792-795, 1999.

ESSEX, M.E., ALLAN, J.S., FOLKS, T.M., HART, C.E., PAVLAKIS, G.N., PANTALEO, G., COHEN, O., GRAZIOSI, C., VACCAREZZA, M., PAOLUCCI, S., DEMAREST, J.F., FAUCI, A.S., HAYNES, B.F. Etiology and Pathogenesis. In: DEVITA JR, V.T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A. (Eds.). *AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*. 4.ed. Philadelphia-PA: Lippincott-Raven Publishers, p. 002-99, 1997.

FEARON, M. The laboratory diagnosis of HIV infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, v. 16 (1), p. 26-30, 2005.

FERREIRA JUNIOR, O.C., FERREIRA, C., RIEDEL, M., WIDOLIN, M.R., BARBOSA-JÚNIOR, A. Evaluation of rapid tests for anti-HIV detection in Brazil. *AIDS*, v. 19 (4), p. S70-S75, 2005.

FIEBIG, E.W., WRIGHT, D.J., RAWAL, B.D., GARRETT, P.E., SCHUMACHER, R.T., PEDDADA, L., HELDEBRANT, C., SMITH, R., CONRAD, A., KLEINMAN, S.H., BUSCH, M.P. Dynamics of HIV Viremia and Antibody Seroconversion in Plasma Donors: Implications for Diagnosis and Staging of Primary HIV Infection. *AIDS*, v. 17 (13), p.1871-1879, 2003.

FISCUS, S.A., CHENG, B., CROWE, S.M., DEMETER, L., JENNINGS, C., MILLER, V., RESPESS, R., STEVENS, W. HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *PLoS Med*. 3, e417, 2006.

FUSUMA, E.E., CARUSO, S.C., LOPEZ, D.F., COSTA, L.J., JANINI, L.M., DE MENDONÇA, J.S., KALLAS, E.G., DIAZ, R.S. Duplication of peri-kappaB and NF-kappab sites of the first human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) transmission in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 21 (11), p.965-70, 2005.

GALLANT, J.E. Approach to the treatment-experienced patient. *Infect Dis Clin N Am*, v. 21 (1), p. 85-102, 2007.

GALLI, R., MERRICK, L., FRIESENHAHN, M., ZIERMANN, R. Comprehensive comparison of the VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) and COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR® 1.5 assays on 1000 clinical specimens. *J Clin Virol*, v. 34 (4), p. 245-252, 2005.

GALLO, R.S., SLISKI, A., WONG-STAAAL, F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. *Lancet*, v. 2 (8356), p. 962-963, 1983.

GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D.L., CHEN, Y., RODENBURG, C.M., MICHAEL, S.F., CUMMINS, L.B., ARTHUR, L.O., PEETERS, M., SHAW, G.M., SHARP, P.M., HAHN, B.H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*, v. 397 (6718), p. 385-386, 1999.

GARCIA-DIAZ, A., CLEWLEY, G.S., BOOTH, C.L., LABETT, W., MCALLISTER, N., GERETTI, A.M. Comparative Evaluation of the Performance of the Abbott Real-Time Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Assay for Measurement of HIV-1 Plasma Viral Load following Automated Specimen Preparation. *J Clin Microbiol*, v. 44 (5), p. 1788–1791, 2006.

GENDLER, S.A., PASCUCCHIO, M.S. Routine HIV screening among blood donors in Buenos Aires (Argentina): Results from six years' experience and report of a single window-period donation. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 25 (2), p. 82 – 90, 2007.

GIBELLINI, D., VITONE, F., GORI, E., LA PLACA, M., RE, M.C. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. *J Virol Methods*, v. 115 (2), p. 183–189, 2004.

GOMES, P., PALMA, A.C., CABANAS, J., ABECASIS, A., CARVALHO, A.P., ZIERMANN, R., DIOGO, I., GONCALVES, F., LOBO, C.S., CAMACHO, R. Comparison of the COBAS TAQMAN HIV-1 HPS with VERSANT HIV-1 RNA 3.0 assay (bDNA) for plasma RNA quantitation in different HIV-1 subtypes. *J Virol Methods*, v. 135 (2), p. 223-228, 2006.

GRIFFITH, B.P., CAMPBELL, S., MAYO, D.R. Human Immunodeficiency viruses. In: MURRAY, P.R., JORGENSEN, J.H., PFALLER, M.A., BARON, E.J., LANDRY, M.L. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9.ed., v. 2. Herndon – USA: ASM Press, p. 1308-1329, 2007.

GUEUDIN, M., PLANTIER, J.C., LEMÉE, V., SCHMITT, M.P., CHARTIER, L., BOURLET, T., RUFFAULT, A., DAMOUND, F., VRAY, M., SIMON, F. Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime Extraction-Quantification Systems for HIV-1 Subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 44 (5), p. 500-505, 2007.

GUNSON, R.N., COLLINS, T.C., CARMAN, W.F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol*, v. 35 (4), p.355-367, 2006.

HAMMER, S.M., SAAG, M.S., SCHECHTER, M., MONTANER, J.S., SCHOOLEY, R.T., JACOBSEN, D.M., THOMPSON, M.A., CARPENTER, C.C., FISCHL, M.A., GAZZARD, B.G., GATELL, J.M., HIRSCH, M.S., KATZENSTEIN, D.A., RICHMAN, D.D., VELLA, S., YENI, P.G., VOLBERDING, P.A. Treatment of Adult HIV Infection: 2006 Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Top HIV Med*, v. 14 (3), p. 827-843, 2006.

HIV DATABASE. HIV and SIV Nomenclature. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html> Acessado em: 15/01/2008.

IOANNIDIS, J.P., TATSIONI, A., ABRAMS, E.J., BULTERY, M., COOMBS, R.W., GOEDERT, J.J., KORBER, B.T., MAYAUX, M.J., MOFENSON, L.M., MOYE Jr, J., NEWELL, M.L., SHAPIRO, D.E., TEGLAS, J.P., THOMPSON, B., WIENER, J. Maternal viral load and rate of disease progression among vertically HIV-1-infected children: an international meta-analysis. *AIDS*, v. 18 (1), p. 99-108, 2004.

JENNINGS, C., FISCUS, S.A., CROWE, S.M., DANILOVIC, A.D., MORACK, R.J., SCIANNA, S., CACHAFEIRO, A., BRAMBILLA, D.J., SCHUPBACH, J., STEVENS, W., RESPESS, R., VARNIER, O.E., GARY, G.E., CORRIGAN, J.S., GRONOWITZ, J.S., USSERY, M.A., BREMER, J.W. Comparison of Two Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA Surrogate Assays to the Standard HIV RNA Assay. *J Clin Microbiol*, v. 43 (12), p. 5950-5956, 2005.

JORDAN, J.A. Real-time detection of PCR products and microbiology. *New technologies for life sciences: A Trends Guide*, v. 12, p. 61-66, 2000.

KAMAT, A., ROVI, V., DESAI, A., SATISHCHANDRA, P., SATISH, K.S., BORODOWSKY, I., SUBBAKRISNA, D.K., KUMAR, M. Quantitation of HIV-1 RNA levels in plasma and CSF asymptomatic HIV-1 infected patients from South India using a TaqMan real time PCR assay. *J Clin Virol*, v. 39 (1), p. 9-15, 2007.

KANDATHIL, A.J., RAMALINGAM, S., KANNANGAI, R., DAVID, S., SRIDHARAM, G. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res*, v. 121 (4), p. 333-334, 2005.

KATSOULIDOU, A., PETRODASKALAKI, M., SYPSA, V., PAPACHRISTOU, E., ANASTASSOPOULOU, C.G., GARGALIANOS, P., KARAFOLIDOU, A., LAZANAS, M., KORDOSSIS, T., ANDONIADOU, A., HATZAKIS, A. Evaluation of the clinical sensitivity for the quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Comparison of the new COBAS TaqMan HIV-1 with three current HIV-RNA assays-LCx HIV RNA quantitative, VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) and COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor v1.5. *J Virol Methods*, v. 131 (2), p.168-174, 2006.

KATZENSTEIN, D., LAGA, M., MOATTI, J.P. The evaluation of the HIV/AIDS Drug Access Initiatives in Côte D'Ivoire, Senegal and Uganda: how access to antiretroviral treatment can become feasible in Africa. *AIDS*, v. 17 (3), p. S1-S4, 2003.

KELLOGG, D.E., SNINSKY, J.J., KWOK, S. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, v. 189 (2), p.202-208, 1990.

KLEIN, S.A., KARSTEN, S., RUSTER, B., KLEBBA, C., PAPE, M., OTTMANN, O.G., HOELZER, D., ROTH, W.K. Comparison of TaqManTM real-time PCR and p24 Elisa for quantification of in vitro HIV-1 replication. *J Virol Methods*, v. 107 (2), p. 169-175, 2003.

KOWALSKA, A., NIEMIEC, T., EL MIDAOU, A., BURKACKA, E. Effect of antiretroviral therapy on pregnancy outcome in HIV-1 positive women. *Med Wieku Rozwoj*, v. 7 (4), p. 459-468, 2003.

LEGOFF, J., BOUHLAL, H., GRE'SENGUET, G., WEISS, H., KHONDE, N., HOCINI, H., DE'SIRE', N., SI-MOHAMED, A., DE DIEU LONGO, J., CHEMIN, C., FROST, H., PE'PIN, J., MALKIN, J.E., MAYAUD, P., BE'LEC, L. Real-Time PCR Quantification of Genital Shedding of Herpes Simplex Virus (HSV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Women Coinfected with HSV and HIV. *J Clin Microbiol*, v. 44 (2), p. 423-432, 2006.

LEITNER, T., KORBER, B., DANIELS, M., CALEF, C., FOLEY, B. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/reviews.html> Acessado em: 04/10/2007.

LOS ALAMOS. Human genes may predict AIDS progression rate. Disponível em: <http://www.lanl.gov/orgs/pa/newsbulletin/2003/07/14/text02.shtml> Acessado em: 10/01/2008.

LOT, F., SEMAILLE, C., CAZEIN, F., BARIN, F., PINGET, R., PILLONEL, J., DESENCLOS, J.C. Preliminary results from the new HIV surveillance system in France. *Euro Surveill*, v. 9 (10), p. 34–37, 2004.

MEISSNER, C., COFFIN, J.M. Os Retrovírus Humano: AIDS e Outras Doenças. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B.I., MEDOFF, G. (Eds). Tradução de VOEUX, P.L. *Microbiologia Mecanismos das Doenças Infecciosas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 310-322, 2002.

MELLORS, J.W., MUÑOZ, A., GIORGI, J.V., MARGOLICK, J.B., TASSONI, C.J., GUPTA, P., KINGSLEY, L.A., TODD, J.A., SAAH, A.J., DETELS, R., PHAIR, J.P., RINALDO JR, C.R. Plasma viral load and CD4_ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*, v. 126 (12), p. 946–954, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. A Sustentabilidade do Acesso Universal a Anti-retrovirais no Brasil. Disponível em: http://www.aids.gov.br/internas_materia.asp?cod_materia=1316&cod_secao=hopkins Acessado em: 10/01/2008a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. “Aids: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento”. Disponível em: http://www.aids.gov.br/assistencia/etiologia_diagnostico.htm Acessado em 07/04/2006a

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Boletim Epidemiológico AIDS - julho a dezembro de 2006/janeiro a junho de 2007. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm> Acessado em 15/01/2008b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Contagem de Células T CD4+ e Testes de Carga Viral: Principais Marcadores Laboratoriais para Indicação e Monitorização do Tratamento

Anti-Retroviral. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/assistencia/Textom.html>
Acessado em: 07/04/2006b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Critérios de definição de casos de AIDS em crianças e adultos. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/main.asp?View={E62A8511-7150-4615-9BFA-10FDC4F4E642}> Acessado em: 10/01/2008c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Fluxograma para detecção de anticorpos Anti-HIV em indivíduos acima de dois anos de idade. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS873A3DC1PTBRIE.htm> Acessado em: 30/12/2007a

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em pediatria. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm> Acessado em: 13/01/2008d.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. PORTARIA Nº 1.015/GM Em 27 de maio de 2004. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-1015.htm> Acessado em: 22/01/2008e.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-Retroviral em Gestantes. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm> Acessado em: 13/01/2008f.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Recomendações para terapias com anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2007/2008. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm> Acessado em: 29/10/2007b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Rede de Cooperação Tecnológica em HIV/AIDS entre 8 Países em Desenvolvimento. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/main.asp?Team=%7B57036654-8045-464E-845B-6AD9A48712C0%7D> Acessado em: 10/02/2008g.

MO, H., MARKOWITZ, M., MAJER, P., BURT, S.K., GULNIK, S.V., SUVOROV, L.I., ERICKSON, J.W., HO, D.D. Design, synthesis, and resistance patterns of MP-134 and MP-167, two novel inhibitors of HIV type 1 protease. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 12 (1), p. 55-61, 1996.

MÜLLER, J., EIS-HÜBINGER, A.M., DÄUMER, M., KAISER, R., ROX, J.M., GÜRTLER, L., HANFLAND, P., PÖTZSCH, B. A novel internally controlled real-time reverse transcription-PCR assay for HIV-1 RNA targeting the pol integrase genomic region. *J Virol Methods*, v. 142 (1-2), p. 127-135, 2007.

MURPHY, D.G., CÔTÉ, L., FAUVEL, M., RENÉ, P., VINCELETTE, J. Multicenter Comparison of Roche COBAS AMPLICOR MONITOR Version 1.5, Organon Teknika

NucliSens QT with Extractor, and Bayer Quantiplex Version 3.0 for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J Clin Microbiol*, v. 38 (11), p. 4034-4041, 2000.

MYLONAKIS, E., PALIOU, M., KICH, J.D. Plasma viral load testing in the management of HIV-1 infection. *Am Fam. Physician*, v. 63 (3), p. 483-490, 2001.

NADLER, J., VERONESI, R., GURRA, M.A.T., VERAS, M.A.DE S.M., RIBEIRO, A.F., MARQUES, A., MASUR, H., BUCHNESS, M.R., NEGRA, M.D., QUEIROZ, W., LIAN, Y.C., GRANATO, C.F.H., LOMAR, A.V., LEWI, D.S., ACCETTURI, C.A., SCHOOLEY, R.T., LEVI, G.C., OSELKA, G. AIDS. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Eds.). *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, p. 83-168. 1996.

NOLTE, F.S., BOYSZA, J., THURMOND, C., CLARK, W.S., LENNOX, J.L. Clinical Comparison of an Enhanced-Sensitivity Branched-DNA Assay and Reverse Transcription-PCR for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Plasma. *J Clin Microbiol*, v. 36 (3), p. 716-720, 1998.

PALELLA JR, J.F., DELORIA-KNOLL, M., CHMIEL, J.S., MOORMAN, A.C., WOOD, K.C., GREENBERG, A.E., HOLMBERG, S.D., THE HIV OUTPATIENT STUDY (HOPS) INVESTIGATORS. Survival Benefit of Initiating Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Persons in Different CD4⁺ Cell Strata. *Ann Intern Med*, v. 138 (8), p. 620-626, 2003.

PALMER, S., WIEGAND, A.P., MALDARELLI, F., BAZMI, H., MICAN, J.M., POLIS, M., DEWAR, R.L., PLANTA, A., LIU, S., METCALF, J.A., MELLORS, J.W., COFFIN, J.M. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*, v. 41 (10), p. 4531-4536, 2003.

PASQUIER, C., SOUYRIS, C., MOINARD, N., BUJAN, L., IZOPET, J. Validation of an automated real-time PCR protocol for detection and quantitation of HIV and HCV genomes in semen. *J Virol Methods*, v. 137 (1), p. 156-159, 2006.

PERRIN, L., KAISER, L., YERLY, S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis*, v. 3 (1), p. 22-27, 2003.

PERRIN, L., PAWLOTSKY, J.M., BOUVIER-ALIAS, M., SARRAZIN, C., ZEUZEM, S., COLUCCI, G. Multicenter performance evaluation of a new TaqMan PCR assay for monitoring human immunodeficiency virus RNA load. *J Clin Microbiol*, v. 44 (12), p. 4371-4375, 2006.

PHILLIPS, A. Short-term risk of AIDS according to current CD4 cell count and viral load in antiretroviral in drug-naïve individuals and those treated in the monotherapy era. *AIDS*, v. 18 (1), p. 51-58, 2004.

PHILLIPS, A.N., STASZEWSKI, S., WEBER, R., KIRK, O., FRANCIOLI, P., MILLER, V., VERNAZZA, P., LUNDGREN, J.D., LEDERGERBER, B. HIV viral load response to

antiretroviral therapy according to the baseline CD4 cell count and viral load. *JAMA*, v. 286 (20), p. 2560-2567, 2001.

POLLARD, V.W., MALLIN, M.H. The HIV rev protein. *Annu Rev Microbiol*, v. 52, p. 491- 532, 1998.

PRADO, J.G., SHINTANI, A., BOFILL, M., CLOTET, B., RUIZ, L., MARTINEZ-PICADO, J. Lack of Longitudinal Inpatient Correlation between p24 Antigenemia and Levels of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 RNA in Patients with Chronic HIV Infection during Structured Treatment Interruptions. *J Clin Microbiol*, v. 42 (4), p. 1620-1625, 2004.

REKHVIASHVILI, N., STEVENS, W., MARINDA, E., GONIN, R., STEVENS, G., MCINTYRE, J., WOOD, R. Clinical performance of an in-house real-time RT-PCR assay using a fluorogenic LUXTM primer for quantitation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *J Virol Methods*, v. 146 (1-2), p. 14-21, 2007.

RIZZARDI, G.P., DE BOER, R.J., HOOVER, S., TAMBUSI, G., CHAPUIS, A., HALKIC, N., BART, P.A., MILLER, V., STASZEWSKI, S., NOTERMANS, D.W., PERRIN, L., FOX, C.H., LANGE, J.M., LAZZARIN, A., PANTALEO, G. Predicting the duration of antiviral treatment needed to suppress plasma HIV-1 RNA. *J Clin Invest*, v. 105 (6): p. 777- 782, 2000.

ROBERTSON, D.L., ANDERSON, J.P., BRADAC, J.A., CARR, J.K., FOLEY, B., FUNKHOUSER, R.K., GAO, F., HAHN, B.H., KUIKEN, C., LEARN, G.H., LEITNER, T., MCCUTCHAN, F., OSMANOV, S., PEETERS, M., PIENIAZEK, D., KALISH, M.L., SALMINEN, M., SHARP, P., WOLINSKY, S., KORBER, B. HIV-1 Nomenclature Proposal A Reference Guide to HIV-1 Classification. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/pdf/1999/4/nomenclature.pdf> Acessado em: 15/01/2008.

ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEMS. Products. Disponível em: http://www.roche.com/home/products/prod_diag.htm Acessado em: 15/01/2008.

ROUET, F., EKOUEVI, D.K., CHAIX, M., BURGARD, M., INWOLEY, A., TONY, T. D'A., DANIEL, C., ANGLARET, X., LEORY, V., MSELLATI, P., DABIS, F., ROUZIOUX, C. Transfer and Evaluation of an Automated, Low-Cost Real-Time Reverse Transcription-PCR Test for Diagnosis and Monitoring of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in a West African Resource-Limited Setting. *J Clin Microbiol*, v. 43 (6), p. 2709-2717, 2005.

SANTOS, A.F., SOUSA, T.M., SOARES, E.A., SANABANI, S., MARTINEZ, A.M., SPRINZ, E., SILVEIRA, J., SABINO, E.C., TANURI, A., SOARES, M.A. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*, v. 20 (16), p. 2011-2019, 2006.

SCHUMACHER, W., FRICK, E., KAUSELMANN, M., MAIER-HOYLE, V., VAN DER VLIET, R., BABIEL, R. Fully automated quantification of human Immunodeficiency virus

(HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® system. *J Clin Virol*, v. 38 (4), p. 304–312, 2007.

SCHVACHSA, N., TURK, G., BURGARD, M., DILERNIA, D., CAROBENE, M., PIPPO, M., GÓMEZ-CARRILLO, M., ROUZIOUX, C., SALOMON, H. Examination of real-time PCR for HIV-1 RNA and DNA quantitation in patients infected with HIV-1 BF intersubtype recombinant variants. *J Virol Methods*, v. 140 (1-2), p. 222-227, 2007.

SIEMENS. VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA). Disponível em: http://diagnostics.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/StoreCatalogDisplay~q_catalogId~e_-111~a_langId~e_-111~a_storeId~e_10001.htm Acessado em: 12/12/2007.

SPEERS, D., PHILLIPS, P., DYER, J. Combination Assay Detecting both Human Immunodeficiency Virus (HIV) p24 Antigen and Anti-HIV Antibodies Opens a Second Diagnostic Window. *J Clin Microbiol*, v. 43 (10), p. 5397-5399, 2005.

STEVENS, G., REKHVIASHVILI, N., SCOTT, L.E., GONIN, R., STEVENS, W. Evaluation of Two Commercially Available, Inexpensive Alternative Assays Used for Assessing Viral Load in a Cohort of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C-Infected Patients from South Africa. *J Clin Microbiol*, v. 43 (2), p. 857-861, 2005.

SUN, R., KU, J., JAYAKAR, H., KUO, J.C., BRAMBILLA, D., HERMAN, S., ROSENSTRAUS, M., SPADORO, J. Ultrasensitive Reverse Transcription-PCR Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J Clin Microbiol*, v. 36(10), p. 2964-2969, 1998.

SWANSON, P., HARRIS, B.J., HOLZMAYER, V., DEVARE, S.G., GERALD SCHOCHETMAN JR, J. Quantification of HIV-1 group M (subtypes A–G) and group O by the LCx HIV RNA quantitative assay. *J Virol Methods*, v. 89 (1-2), p. 97-108, 2000.

SWANSON, P., DE MENDOZA, C., JOSHI, Y., GOLDEN, A., HODINKA, R.L., SORIANO, V., DEVARE, S.G., HACKETT JR, J. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Genetic Diversity on Performance of Four Commercial Viral Load Assays: LCx HIV RNA Quantitative, Amplicor HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. *J Clin Microbiol*, v. 43 (8), p. 3860-3868, 2005.

SWANSON, P., HOLZMAYER, V., HUANG, S., HAY, P., ADEBIYI, A., RICE, P., ABRAVAYA, K., THAMM, S., DEVARE, S.G., HACKETT JR, J. Performance of the automated Abbott RealTime HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from London: comparison to VERSANT HIV-1 RNA 3.0, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, and LCx HIV RNA Quantitative assays. *J Virol Methods*, v. 137 (2), p. 184-192, 2006a.

SWANSON, P., HUANG, S., HOLZMAYER, V., BODELLE, P., YAMAGUCHI, J., BRENNAN, C., BADARO, R., BRITES, C., ABRAVAYA, K., DEVARE, S.G., HACKETT JR, J. Performance of the automated Abbott RealTime HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from Brazil. *J Virol Methods*, v. 134 (1-2), p. 237-243, 2006b.

SWANSON, P., HUANG, S., ABRAYAYA, K., DE MENDOZA, C., SORIANO, V., DEVARE, S.G., HACKETT JR, J. Evaluation of performance across the dynamic range of the Abbott RealTime HIV-1 assay as compared to VERSANT HIV-1 RNA 3.0 and AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 using serial dilutions of 39 group M and O viruses. *J Virol Methods*, v. 141 (1), p. 49-57, 2007.

TANG, N., HUANG, S., SALITURO, J., MAK, W.B., CLOHERTY, G., JOHANSON, J., LI, Y.H., SCHNEIDER, G., ROBINSON, J., HACKETT JR., J., SWANSON, P., ABRAYAYA, K. A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. *J Virol Methods*, v.146 (1-2), p. 236-245, 2007.

TATT, I.D., BARLOW, K.L., CLEWLEY, J.P., GILL, O.N., PARRY, J.V. Surveillance of HIV-1 subtypes among heterosexuals in England and Wales, 1997–2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 36 (5), p. 1092–1099, 2004.

UNAIDS. 2007 AIDS Epidemic Update. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/2007default.asp> Acessado em: 02/01/2008.

UNAIDS. 25 years of Aids. Disponível em: http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2006/2006GlobalReport_FullPresentation_en.ppt Acessado em: 26/09/2007a.

UNAIDS. Regional HIV and Aids statistics and features, 2006. Disponível em: <http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2006/2006EpiUpdateSlide002.ppt> Acessado em: 26/09/2007b.

VITONE, F., GIBELLINI, D., SCHIAVONE, P., RE, M.C. Quantitative DNA proviral detection in HIV-1 patients treated with antiretroviral therapy. *J Clin Virol*, v. 33 (3), p. 194-200, 2004.

YARCHOAN, R., BRODER, S. Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. *N Engl J Med*, v. 316 (9), p. 557-564, 1987.

WORKING GROUP OF OFFICE OF AIDS RESEARCH ADVISORY COUNCIL (OARAC). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1 Infecteds Adults and Adolescents. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/Guidelines/GuidelineDetail.aspx?MenuItem=Guidelines&Search=Off&GuidelineID=7&ClassID=1> Acessado em: 26/10/2007.

APÊNDICE

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS E ANIMAIS

TERMO DE AVALIAÇÃO

CEP-ULBRA 2006-256H									
Título: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE HIV-1 (REAL-TIME RT-PCR NESTED E AMPLICOR HIV-1 MONITOR V1.5)									
Autor e Pesq. Resp: Renata Ticiani									
P. Orient: Vagner Ricardo Lunge									
Tipo de projeto: ☐ Pesquisa ☐ Doutorado (tese) ☒ Mestrado (Dissertação) ☐ TCC (Pós Lato Sensu) ☐ TCC (Graduação) Grupo: III									
Curso: PPGDGM Dir. Pesq.: Ingresso: 10/08/2006									
Instituição onde será realizada: Ulbra Canoas/RS									
Número de		No centro: 100/150		Projeto		☐ Sim ☒ Não		☒ Nacional	
Sujeitos		Total: 100/150		Multicêntrico:		☒ Não		Cooperação	
Patrocinador:		Autora						Estrangeira: ☒ Não	
Data: Reunião Ordinária de 31/08/2006									

O projeto de pesquisa, acima identificado, foi avaliado e aprovado pelo plenário do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA, por estar de acordo com as normas vigentes na Resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e em suas complementares (Resoluções 240/97, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00 e 340/04 do CNS/MS) que regulamentam a pesquisa envolvendo seres humanos.

O (a) pesquisador (a) responsável deverá apresentar relatório(s) anual(is) e final a este CEP, informando os resultados da pesquisa, bem como comunicar a data de conclusão da mesma.

Canoas, 01 de setembro de 2006.


DR. JOSÉ SCHNEIDER SANTOS
Coordenador do CEP-ULBRA

Rua Farroupilha, 8001 - Prédio -14 Sala 224 - Bairro São José - Canoas/RS - CEP 92.425-900
Fone (51) 3477-9217- E-mail: comitedeetica@ulbra.br – Home Page: www.ulbra.br/pesquisa

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](#)