

Maércio José de Oliveira Alho

**Validação de Resultados de Carga Viral do HIV-1
obtidos para insumos/kits/equipamentos de
diferentes procedências**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Médica (Mestrado Profissional) para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-Orientadora: Dra Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Alho, Maércio José de Oliveira.

Validação de resultados de carga viral do HIV-1 obtidos para insumos/kits-
/equipamentos de diferentes procedências / Maércio José de Oliveira Alho. –
Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universida-
de Estadual Paulista, 2010.

Orientadora: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Assunto CAPES: 40101096

1. HIV-1 2. HIV(Vírus)

CDD 616.9

Palavras-chave: Branched-DNA;, Carga Viral; HIV

*Aos meus pais pelo imenso carinho, pela compreensão,
pela ajuda, pelo estímulo e pela presença marcante e
orientadora.*

Agradecimentos

À minha família, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo amor e compreensão.

À minha orientadora, Profa. Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela oportunidade de me encaminhar na pesquisa, pelos ensinamentos, amizade, apoio, estímulo e confiança depositada em mim.

À minha co-orientadora Dra Rejane Maria Tommasini Grotto, pela paciência, amizade e que sempre nos momentos difíceis me deu apoio para continuar com o meu crescimento profissional.

À Rita de Cássia Alvarado e a Lilian Reis Munhoz, pela amizade, paciência e ajuda na parte de informática.

Ao Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP na pessoa do Dr José Mauro Zanini, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, Rotinas Diagnósticas, na pessoa da Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela disponibilização da estrutura física e equipamentos utilizados neste estudo.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, pelo apoio, companheirismo e ajuda nos momentos difíceis.

Ao Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais, pelo financiamento pela disponibilização dos kits para execução desse trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu pela atenção e dedicação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, pela disponibilidade e atenção.

A Janisse, pela atenção e dedicação em todos os momentos em que precisei.

Aos pacientes sem os quais a realização desse trabalho não seria possível.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste estudo fosse possível.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

Figura 1. Esquema ilustrativo da estrutura do HIV22

Figura 2. Distribuição geográfica dos Laboratórios de Carga Viral no território nacional, evidenciando o número de laboratórios por estado.....24

Tabela 1. Concordância dos resultados de carga viral nos diferentes grupos. (G1): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 8 horas após a coleta; (G2): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 10 horas após a coleta; (G3): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 12 horas após a coleta; (G4): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 24 horas (overnight) após a coleta..... 38

Tabela 2. Concordância dos resultados de carga viral nos diferentes grupos. (G5) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 1 dia, antes do processamento; (G6) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 2 dias, antes do processamento; (G7) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 3 dias, antes do processamento; (G8) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 4 dias, antes do processamento..... 39

Tabela 3. Concordância dos resultados de carga viral de amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, armazenado em -70°C conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi colocado sob refrigeração (isopor com gelox) por (G9): 12 horas; (G10): 24 horas. 40

Tabela 4. Distribuição dos valores concordantes e discordantes por Grupo estudado. G1: amostras com Carga Viral Plasmática (CVP) inferior ao limite de detecção da técnica (50 cópias de RNA/mL); G2: amostras com CVP entre 50 e 1.000 cópias de RNA/mL; G3: amostras com CVP entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA/mL; G4: amostras com CVP entre 10.000 e 100.000 cópias de RNA/mL e G5: amostras com CVP acima de 100.000 cópias de RNA/mL..... 48

Tabela 5. Concordância dos resultados utilizando os volumes iniciais de 200µL e 500µL, quando se considera amostras com carga viral indetectável (G1)..... 48

Tabela 6. Concordância dos resultados utilizando os volumes iniciais de 200µL e 500µL, quando se considera amostras com carga viral entre 50 a 1.000 cópias de RNA/ml (G2).....	49
Tabela 7. Concordância dos resultados utilizando os volumes iniciais de 200µL e 500µL, quando se considera amostras com carga viral entre 1.000 a 10.000 cópias de RNA/ml (G3).....	49
Tabela 8. Concordância dos resultados utilizando o volume inicial de 200µL, quando se considera amostras com carga viral entre 50 a 1.000 cópias de RNA/ml (G2).....	50
Tabela 9. Concordância dos resultados utilizando o volume inicial de 200µL, quando se considera amostras com carga viral entre 1.000 a 10.000 cópias de RNA/ml (G3).....	51
Tabela 10. Resultados obtidos com o processamento das amostras nas plataformas System 340 Analyzer e Versant™ 440 Molecular System	58
Tabela 11. Resultados do tempo demandado para cada operação nas duas plataformas, System 340 e Versant 440.	59
Tabela 12. Distribuição dos valores de Carga Viral Plasmática segundo Quantiplex X Nuclisens	66
Tabela 13. Distribuição dos valores de Carga Viral Plasmática segundo Quantiplex X Amplicor.....	66
Tabela 14. Distribuição dos valores de Carga Viral Plasmática segundo Amplicor X Nuclisens.....	67

Tabela 15. Medidas descritivas e resultado do teste estatístico obtido para o Grupo 1 (G1): Amostras com carga viral plasmática superior a 400 cópias de RNA/mL...
..... 68

Tabela 16. Medidas descritivas e resultado do teste estatístico obtido para o Grupo 2 (G2): Amostras com carga viral plasmática superior a 400 cópias de RNA/mL...
..... 69

Em 1997 o Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais estruturou em todo Brasil uma rede de laboratórios para realizar o exame de Carga Viral Plasmática do HIV (CV) denominada Rede Nacional de Carga Viral. O exame quantifica o RNA do HIV no plasma do paciente infectado utilizando a metodologia do *branched*-DNA, um ensaio de amplificação do sinal luminescente, o qual utiliza uma plataforma de detecção. Atualmente, esta rede é reconhecida internacionalmente e realiza 520.000 exames/ano. No entanto, vários fatores podem influenciar o resultado do exame como integridade do RNA, volume de amostra disponível, método e plataforma utilizados. Assim, o Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais implantou um protocolo pré-analítico para ser utilizado em todo o território nacional. Entretanto, as regiões brasileiras são muito diferentes e alguns laboratórios não conseguem seguir este protocolo. O objetivo deste estudo foi (a) avaliar as diferentes condições de transporte e armazenamento das amostras utilizadas no teste de CV, (b) validar a utilização de volumes iniciais de plasma inferiores ao preconizado, (c) comparar plataformas de detecção e (d) metodologias disponíveis para a execução do exame. Os resultados mostraram que as amostras podem ser processadas em até 8 h sem perda ou degradação do RNA, volumes iniciais inferiores ao preconizado podem ser utilizado com perda de sensibilidade e, as duas plataformas disponíveis no Brasil são equivalentes para a execução do teste. Apesar de existirem outras metodologias para a realização do teste, os resultados podem ser diferentes mostrando a necessidade da utilização da mesma metodologia em todo Brasil.

The Department of the DST/AIDS and Viral Hepatitis implemented since 1997 a laboratory network in all Brazil to perform the HIV plasma viral load (PVL) test named Viral Load National Network as part of the attendance to infected patient. This exam quantify the HIV plasma RNA in infected patient using Branched-DNA methodology, a signal amplification nucleic acid probe assay, which use a detection platform. Nowadays this network has international appreciation and to execute 520.000 tests/year. However, several factors can alter the result of the test as RNA integrity, available sample volume, used method and detection platform. Then an optimized pre-analytic protocol was implanted by Department of the DST/Aids to be used in all national territory. However the Brazil regions are many different and some laboratories don't get lead this protocol. The goal of this study was (a) to evaluate the different transport and storage conditions of the samples used to the PVL test, (b) to valid the use of the lower plasma initial input in the exam, (c) to compare the detection platforms and (d) methods available to execution of the test. The results showed blood sample can be process in until 8h after collection without RNA loss or degradation, lower initial input can be used with loss of sensibility and the two detection platforms available in Brazil are equivalent. In spite of others methods are available to execution of test, the results can be distinct showing the importance of the all laboratories in Brazil used the same method.

Introdução	22
Objetivos	29
Capítulo 1: Transporte e armazenamento de amostras destinadas à quantificação do RNA do HIV-1 pela metodologia branched-DNA.....	31
Casuística e Metodologia.....	33
Casuística.....	34
Metodologia.....	36
Resultados e Discussão.....	37
Capítulo 2: A utilização de 200µL e 500 µL como input inicial na quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 pelo b-DNA.....	42
Casuística e Métodos.....	44
Casuística.....	45
Metodologia.....	46
Resultados e Discussão.....	47
Capítulo 3: Avaliação do desempenho das plataformas <i>System 340 Analyzer</i> e <i>Versant™ 440 Molecular System</i> na rotina da determinação da carga viral plasmática do HIV-1 pelo b-DNA;	55
Casuística e Métodos.....	55
Casuística.....	58
Metodologia.....	58
Resultados e Discussão.....	59
Capítulo 4: Estudo de Equivalência dos três ensaios para a quantificação do RNA plasmático do HIV-1	63
Casuística e Métodos.....	65
Casuística.....	66
Metodologia.....	66
Resultados e Discussão.....	67
Referências Bibliográficas	73

A aids, doença descrita pela primeira vez na década de 80, caracteriza-se por uma imunossupressão conseqüente à infecção por um retrovírus denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), da família **Retroviridae**, gênero *lentivirus*; o qual infecta células do sistema imunológico humano como linfócitos e macrófagos, além de outros tipos celulares (ABBAS, 1998).

A partícula viral infectante, denominada *virion*, apresenta 110nm de diâmetro, forma esférica, genoma diplóide constituído de duas moléculas de RNA de fita simples, idênticas, com 9,8 Kb de comprimento. O RNA viral encontra-se localizado no interior de um nucleocapsídeo protéico, circundado por um envelope lipoprotéico, cuja porção lipídica é derivada da célula hospedeira e as glicoproteínas são de origem viral (BRASIL, 2007).

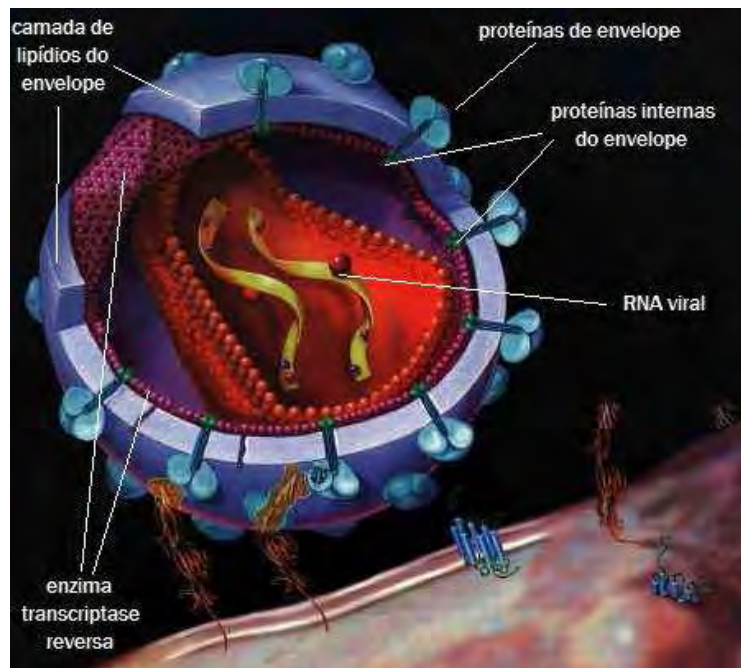


Figura 1: Esquema ilustrativo da estrutura do HIV. Fonte: http://insightpublicidade.files.wordpress.com/2008/04/hiv_virus.jpg

O genoma do HIV é constituído por genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*) e regulatórios (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*). Os produtos do gene *gag* constituem as proteínas da matriz (p17), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo viral (p9). O gene *pol* codifica as enzimas virais protease (p10), transcriptase reversa Rnase-H (p51/66) e integrase (p32), essenciais ao ciclo replicativo do HIV. Os demais genes expressam proteínas não estruturais regulatórias (BRASIL, 2007).

Com o advento da aids no Brasil em 1983, foram implantados programas de controle da doença em São Paulo e Rio de Janeiro, marcando a criação formal da divisão Nacional de DST e Aids. Alguns anos mais tarde, em 1985, após a identificação do vírus e a liberação dos primeiros testes diagnósticos, foi criado o Programa Nacional DST e Aids, o qual, visa melhorar a qualidade de vida dos soropositivos para o HIV, promovendo ações de assistência, prevenção e monitoramento da doença, atuando desde o diagnóstico até o tratamento do paciente infectado pelo HIV (BRASIL, 2008).

Atualmente, o então Programa Nacional DST e Aids, agora Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, é reconhecido internacionalmente e, na área laboratorial disponibiliza, além dos exames diagnósticos, os exames laboratoriais de monitoramento da infecção pelo HIV: contagem de linfócitos T CD4, que avalia a imunocompetência celular, carga viral plasmática, que reflete a atividade replicativa do vírus (BRASIL, 2001) e genotipagem, que determina a resistência aos anti-retrovirais utilizados. Além disso, também disponibiliza todo um suporte de Bioinformática e armazenamento de dados, representado por um conjunto de banco de dados: Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (Siscel), Sistema de Controle Logístico de Medicamentos Anti-Retrovirais (Siclom) e Sistema de Informação para Rede de Genotipagem (Sisgeno). (BRASIL, 2008).

O Departamento atinge, atualmente, todo o território nacional com 80 laboratórios de Carga Viral, 89 laboratórios de CD4/CD8 e 21 laboratórios de Genotipagem. A figura 2 representa a distribuição dos laboratórios de Carga Viral no país.

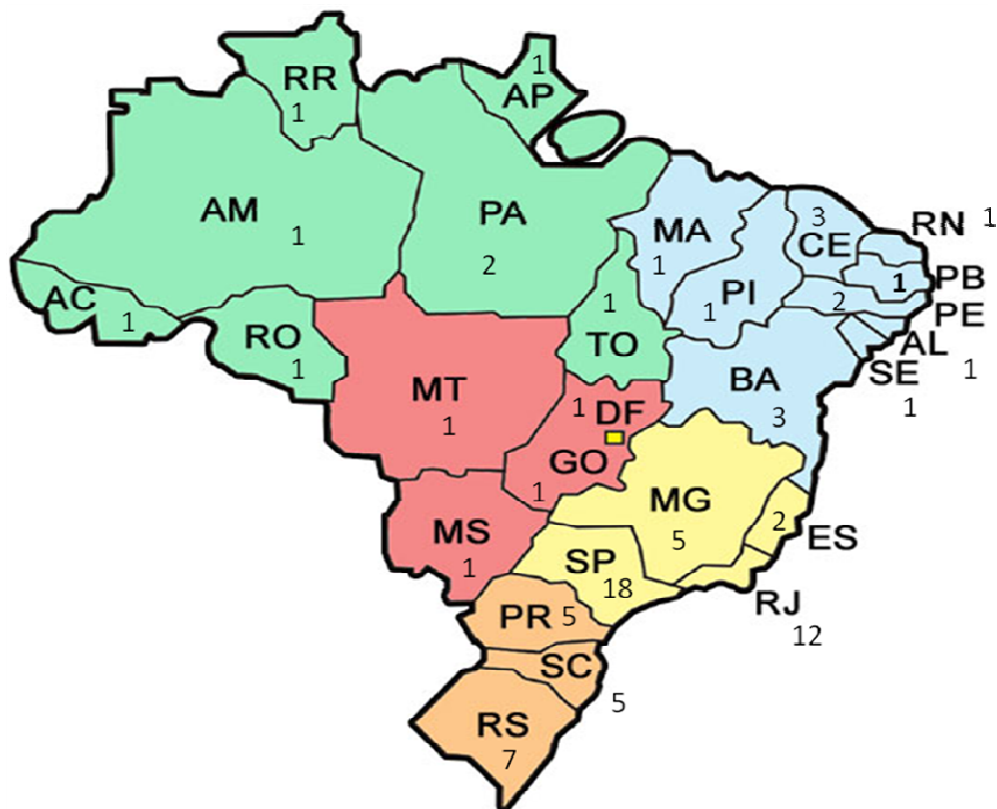


Figura 2: Distribuição geográfica dos Laboratórios de Carga Viral no território nacional, evidenciando o número de laboratórios por estado. Fonte: Adaptado de cepa.epagri.sc.gov.br

No contexto laboratorial, a determinação da carga viral plasmática é um exame de extrema relevância utilizado no monitoramento da infecção pelo HIV, uma vez que reflete a dinâmica da infecção, sendo que quantifica os vírus que estão sendo produzidos e lançados na corrente sanguínea (BRASIL, 2001). A determinação da carga viral com exatidão e precisão é essencial na compreensão da história natural da infecção pelo HIV, da evolução e prognóstico da doença e para avaliar a resposta aos esquemas terapêuticos instituídos e vacinas. A prova da utilidade clínica do teste de determinação da carga viral e o desenvolvimento de muitos ensaios disponíveis no comércio têm levado a um aumento dramático no uso destas determinações para conduzir a terapêutica dos pacientes (MELLORS et al., 1996; TILLER et al., 1997).

Atualmente, a Rede Nacional de Carga Viral disponibiliza 520.000 testes anuais para monitoramento da infecção pelo HIV no Brasil (BRASIL, 2009).

Durante estes 10 anos de existência da Rede Nacional de Carga Viral no Brasil três metodologias foram utilizadas pelos laboratórios da rede; a Reação em Cadeia da Polimerase precedida de transcrição Reversa (RT-PCR), a Amplificação Mediada por Transcrição (TMA) e o DNA ramificado (b-DNA). A RT-PCR é um teste

que envolve transcrição reversa seguida de amplificação por PCR, e o produto amplificado é detectado por um ensaio do tipo ELISA. O RNA do HIV é quantificado simultaneamente a um RNA sintético (controle interno da reação), o qual facilita a detecção por possibilitar a comparação da absorbância obtida para o teste e o controle (MULDER et al., 1994). Atualmente a RT-PCR pode ser realizada em tempo real, por um método que determina a quantidade inicial de um produto (DNA/RNA) através do comportamento da cinética de amplificação das diferentes fases ao longo dos ciclos de uma PCR, ou seja, detecta e quantifica, em tempo real, ácidos nucléicos enquanto são amplificados, sem a necessidade de realizar purificação e análises adicionais. O b-DNA é um procedimento de hibridação tipo sanduíche do ácido nucléico para a quantificação direta do HIV-1 RNA no plasma humano. O sinal de luminescência de uma sonda de DNA que se liga ao RNA viral é amplificado pela utilização de DNAs ramificados e, a seguir detectado por reação de quimioluminescência (PACHL et al., 1995). O TMA constitui um ensaio de amplificação mediada por transcrição, o qual emprega amplificação isotérmica do ácido nucléico viral, seguida de detecção por eletroquimioluminescência (VAN GEMEN et al., 1993).

Muitos estudos vêm sendo realizados no sentido de determinar a equivalência das metodologias (SCHUURMAN et al., 1996; LIN, PEDNEAULT, HOLLINGER, 1998). Embora os estudos realizados por ocasião da implantação dos testes tenham demonstrado resultados concordantes e uma alta correlação entre os resultados (NOLTE et al., 1998; LIN, PEDNEAULT, HOLLINGER, 1998, GINOCCHIO, 1998), discordância vêm sendo encontradas mais recentemente sobretudo quando existe variabilidade do subtipo do HIV (GURTLER et al., 1994).

Foram identificados dois tipos de HIV: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 foi classificado em três grupos: M (major), O (outlier) e N (new), e o grupo M, mais prevalente atualmente, é composto por nove subtipos distintos (A, B, C, D, F, G, H, J, K) (TAVEIRA, 2002).

Diante desta ampla variabilidade genética do HIV, a utilização dos ensaios para quantificação da carga viral para os subtipos não-B têm encontrado dificuldades. A forma dominante no Brasil é o subtipo B, no entanto, também foram identificados, em menor proporção, os subtipos F, C e recombinantes (DIAZ, 2002).

Atualmente, a carga viral plasmática do HIV-1 é realizada em todos os 80 laboratórios de carga viral integrantes da Rede Nacional de Carga Viral do Programa

Nacional de DST e Aids, pela metodologia b-DNA. A plataforma de semi-automação utilizada é o *System 340 Analyzer* (Siemens).

O *System 340 Analyzer* apresenta flexibilidade para processar no mínimo 12 e, no máximo 168 amostras simultaneamente: detecta automaticamente os erros ocorridos durante as operações e gera resultados em cópias de RNA/ml. Recentemente tornou-se disponível no mercado o *Versant™ 440 Molecular System*, como nova alternativa para automação do b-DNA, o qual simplifica os ensaios e elimina a pipetagem pelo técnico no segundo dia e o risco de contaminação cruzada. O novo sistema utiliza, ainda, uma automação flexível, possibilitando o preparo automático dos reagentes e a pipetagem na fase final do exame (BRASIL, 2007), no entanto esta plataforma não está ainda disponível para os laboratórios da rede, devido a necessidades de se definir as vantagens e limitações desta plataforma para a realidade nacional.

Embora seja indiscutível a utilidade clínica do teste de carga viral plasmática do HIV-1 no monitoramento da infecção, existem casos em que devido a limitações da técnica empregada atualmente no Brasil (b-DNA), a realização do exame torna-se inviável. O ensaio de b-DNA permite a quantificação de cargas virais que oscilam entre 50 e 500.000 cópias de RNA/mL (SAWYER et al., 1998). No entanto, tal metodologia necessita de um volume inicial de plasma de 1000µL, (SIEMENS, 2007) volume este que nem sempre é disponível devido às dificuldades de coleta, principalmente em crianças.

Estudos anteriores demonstram que quando o volume inicial é superior ao exigido pela técnica ocorre um aumento de sensibilidade, no entanto, no extremo oposto, quando o volume inicial utilizado é inferior ao exigido pelo método o limite de detecção da técnica se eleva, reduzindo a sensibilidade da metodologia. No entanto, tais estudos foram realizados utilizando amostras com carga viral superior a 1000 cópias de RNA/mL e não foram realizados para o *Branched-DNA* (MURPHY et al., 2000). Nestes casos existe a necessidade de verificar a equivalência de *inputs* iniciais menores e validar os resultados obtidos para estes casos.

A quantificação da carga viral plasmática utiliza como ponto de partida o RNA viral circulante no plasma, no entanto, como o RNA é uma molécula extremamente instável e facilmente degradável para que exista a garantia de um resultado quantitativo seguro e exato o material biológico do paciente (sangue) deve

chegar ao laboratório executor do exame num prazo máximo de 4 horas para que a amostra possa ser processada em tempo hábil e o RNA seja preservado, garantindo a qualidade do exame (BRASIL, 2007).

Atualmente, os laboratórios executores da rede de carga viral contam com outro problema de natureza geográfica devido à distância dos pontos de coleta aos pontos executores, gerando dificuldades para que este prazo de quatro horas seja cumprido. Neste contexto, existe a necessidade de determinar se existem condições de ampliar este tempo e sob que condições este transporte poderia ser realizado sem se comprometer o resultado do exame.

Neste cenário, a proposta deste estudo é buscar soluções dos problemas oriundos do dia-a-dia da Rede Nacional de Carga Viral no que se refere à padronização de algumas etapas pré-analíticas e analíticas, em todo território nacional.

1. Avaliar a equivalência dos resultados dos exames de carga viral simulando diferentes condições de transporte e tempo de espera para realização do teste;
2. Avaliar a equivalência dos resultados de carga viral utilizando volumes iniciais de 500 μ L e 200 μ L de plasma quando comparados ao volume de 1000 μ L preconizados pelo teste;
3. Avaliar o desempenho das plataformas *System 340 Analyzer* (Siemens) e *Versant™ 440 Molecular System* (Siemens), na rotina da determinação da carga viral plasmática do HIV-1 pelo b-DNA;
4. Comparar as três metodologias comerciais já utilizadas na Rede Nacional de Laboratórios de Carga Viral para quantificação do RNA plasmático do HIV-1 a fim de inferir sobre as vantagens e limitações de cada método.

***Transporte e armazenamento de amostras
destinadas à quantificação do RNA do HIV-1
pela metodologia branched-DNA***

Casuística

Para avaliar as variações nos resultados de carga viral devido a diferentes condições de transporte e armazenamento foram realizadas várias simulações utilizando 237 amostras de pacientes com solicitação médica para o exame de carga viral plasmática do HIV-1. Todas as amostras foram submetidas ao exame de carga viral do HIV-1 e, neste momento todas as amostras apresentavam-se em condições adequadas de coleta, transporte e armazenamento, segundo preconizado no Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu. O resultado da carga viral neste momento foi considerado como padrão para a realização das análises. Foram considerados discordantes resultados com diferença igual ou superior a 0,5 log do resultado padrão obtido na rotina.

Uma alíquota das mesmas 237 amostras foram submetidas à condições que simulavam transporte e armazenamento inadequado segundo o POP da carga viral, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu. As amostras foram divididas em 10 grupos e, cada grupo simulava uma determinada situação relacionada a condições de transporte e/ou armazenamento inadequados.

➤ Simulação de Transporte inadequado do tubo primário.

As amostras que constituem os grupos 1, 2, 3 e 4 foram submetidas a simulação que representava o atraso no transporte da amostra de sangue total em seu tubo original (tubo primário) do ponto de coleta até o laboratório executor do exame.

G1: 23 amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 8 horas após a coleta.

G2: 28 amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 10 horas após a coleta.

G3: 28 amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 12 horas após a coleta.

G4: 28 amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 24 horas (*overnight*) após a coleta.

➤ Simulação de Armazenamento inadequado.

As amostras que constituem os grupos 5, 6, 7 e 8 foram submetidas a simulação que representava envio da amostra do ponto de coleta ao laboratório executor já fracionada (plasma), o qual foi armazenado inadequadamente no ponto de coleta. Para o armazenamento de plasma o preconizado pelo POP é freezer -70°C.

G5: 20 amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por um dia, antes do processamento.

G6: 20 amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por dois dias, antes do processamento.

G7: 20 amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por três dias, antes do processamento.

G8: 20 amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por quatro dias, antes do processamento.

➤ Simulação de Transporte inadequado de plasma.

As amostras que constituem os grupos 9 e 10 foram submetidas a simulação que representava envio das amostras do ponto de coleta ao laboratório

executor já fracionada (plasma), o qual foi armazenado adequadamente no ponto de coleta, mas com o transporte inadequado até o laboratório executor. Para o transporte de plasma o preconizado pelo POP é utilizar gelo seco.

G9: 25 amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, armazenada a -70°C , conforme preconizado pelo POP, no entanto, mantida em gelo reciclável por 12 horas, antes do processamento.

G10: 25 amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, armazenada a -70°C , conforme preconizado pelo POP, no entanto, mantida em gelo reciclável por 24 horas, antes do processamento.

Metodologia

A metodologia utilizada foi o *Branched-DNA* (b-DNA) na forma do kit comercial *Quantiplex HIV QT Assay*, Siemens®, segundo as especificações do fabricante.

Resultados e Discussão

Atualmente, as grandes extensões do território nacional é um problema constante para os laboratórios da Rede Nacional de Carga Viral, pois o transporte das amostras do ponto de coleta até o laboratório executor deve de ser realizado em um prazo máximo de 4 horas, para que o laboratório tenha tempo suficiente para preparar as amostras (SIEMENS, 2007).

A quantificação do RNA do HIV-1 (carga viral) é considerada o marcador laboratorial mais adequado tanto para o estabelecimento do prognóstico de indivíduos infectados quanto para o monitoramento de resposta terapêutica aos anti-retrovirais e para a avaliação da progressão da doença. Com base nessas quantificações, sabe-se que níveis de carga viral estão associados à queda rápida da população de linfócitos TCD4+/CD8+ e à progressão mais rápida para aids (BRASIL, 2009).

Quando se considera a relevância clínica do exame, a carga viral é realizada utilizando como ponto de partida o RNA plasmático, uma vez que o RNA presente no plasma representa a dinâmica da infecção, quantificando os vírus que estão sendo produzidos e lançados na circulação no momento da coleta do exame (SIEMENS, 2007).

A utilização laboratorial de amostras para obtenção de RNA enfrenta algumas limitações técnicas principalmente devido a baixa estabilidade do RNA. Moléculas de RNA podem ser rapidamente degradadas por endonucleases específicas e inespecíficas se a amostra não for estabilizada em um curto período de tempo após a coleta. Atualmente, várias estratégias para estabilização do RNA na amostra vêm sendo propostas como a utilização de tubos de coleta com soluções estabilizadoras de RNA (FAN e HEGDE, 2005). No entanto, tais estratégias acabam aumentando o ônus financeiro do exame (QIAGEN, 2009). No Brasil, a estratégia adotada pelo Ministério da Saúde, na Rede Nacional de Carga Viral, foi estabelecer um prazo máximo de quatro horas do momento da coleta da amostra até a chegada ao laboratório executor (SIEMENS, 2007).

No entanto, sabe-se que as distâncias de algumas cidades (BRASIL, 2008) e, também, as condições desfavoráveis das estradas brasileiras acabam tornando inviável o prazo das 4 horas permitidas entre o ponto de coleta e o laboratório.

Na tabela 1 estão expressos os resultados obtidos quando se simulou diferentes condições de transporte de amostras.

Tabela 01: Concordância dos resultados de carga viral nos diferentes grupos. (G1): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 8 horas após a coleta; (G2): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 10 horas após a coleta; (G3): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 12 horas após a coleta; (G4): amostras mantidas em gelo reciclável, processadas 24 horas (overnight) após a coleta.

Amostras	G1	G2	G3	G4
Concordante	23	20	20	17
Discordante	00	08	08	11
Total	23	28	28	28

Nota-se que o resultado da carga viral das amostras processadas em até 8 horas após a coleta (G1) foram concordantes e, portanto a degradação de RNA não alterou quantitativamente o resultado e, portanto, não houve comprometimento do exame. Por outro lado, os resultados obtidos das amostras processadas após 10 (G2), 12 (G3) e 24 (G4) horas se distanciam do real, sugerindo que a degradação do RNA viral comprometeria o resultado do exame. Os resultados das amostras processadas após 10 horas já apresentaram uma queda na carga viral de 0,7-0,8 log, sugerindo que amostras que forem processadas num tempo de 10 horas ou mais após a coleta poderiam apresentar resultados inferiores ao real.

Segundo as especificações do POP, para que não haja comprometimento do exame é necessário que o plasma separado seja armazenado em freezer a -70°C para conter a degradação do RNA viral.

No entanto, existem regiões brasileiras que não dispõem de equipamentos necessários para armazenar amostras de carga viral em condições ideais (freezer -70°C ou nitrogênio líquido) para posterior envio ao laboratório executor da carga viral, sem que exista comprometimento da amostra (SIEMENS, 2007).

A tabela 2 mostra os resultados obtidos quando se simulou diferentes condições de armazenamento das amostras destinadas ao exame de carga viral plasmática do HIV-1.

Tabela 02: Concordância dos resultados de carga viral nos diferentes grupos. (G5) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 1 dia, antes do processamento; (G6) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 2 dias, antes do processamento; (G7) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 3 dias, antes do processamento; (G8) amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi armazenado em freezer -20°C por 4 dias, antes do processamento.

Amostras	G5 – 1 dia	G6 – 2 dias	G7 – 3 dias	G8 – 4 dias
Concordante	19	18	20	17
Discordante	01	02	00	03
Total	20	20	20	20

O plasma armazenado a -20°C por 1 dia apresentou um resultado discordante, sendo que essa amostra apresentou menor carga viral que a real, passando a ser indetectável. Por outro lado, os testes de armazenamento de 2 e 4 dias mostraram cargas virais superiores a real, sugerindo que quando o plasma é armazenado a -20°C por dois dias ou mais possa existir algum interferente que altere o resultado do exame.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos para amostras cujo plasma foi separado dentro do prazo estipulado pelo POP (quatro horas), armazenado em -70°C e, posteriormente colocado em caixas de isopor com gelox por diferentes tempos (12 e 24 horas). Amostras de plasma transportadas nesta situação não mostraram discrepância após 12 ou 24 horas em gelox. No entanto, isto representa

uma situação ideal, uma vez que a maioria dos pontos de coleta não dispõe de freezer -70^oC.

Tabela 03: Concordância dos resultados de carga viral de amostras cujo plasma foi separado em 4 horas, armazenado em -70^oC conforme preconizado pelo POP, no entanto, este plasma foi colocado sob refrigeração (isopor com gelox) por (G9): 12 horas; (G10): 24 horas.

Amostra	G9 – 12h	G10 – 24h
Concordantes	25	25
Discordantes	00	00
Total	25	25

Assim, diante dos problemas de transporte e armazenamento enfrentados hoje pela Rede Nacional de Carga Viral, a elevação do tempo preconizado para o transporte entre a coleta e o ponto executor das amostras no tubo primário poderia ser elevado de 4 para 8 horas. Quando existir a possibilidade de separação do plasma no ponto de coleta o mesmo deve, ser transportado ao laboratório executor dentro de 1 dia se armazenado em -20^oC. No entanto, para implementação desta situação medidas administrativas de treinamento de recursos humanos, disponibilização de material de consumo e equipamentos e infra-estrutura física nos pontos de coleta devem ser considerados.

A utilização de 200 μ L e 500 μ L como input inicial na quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 pelo b-DNA

Casuística

Para validar a utilização de volumes iniciais de 500 e/ou 200µL de plasma no exame de carga viral do HIV-1, 501 amostras foram, inicialmente, subdivididas em cinco grupos, de acordo com o resultado do exame de carga viral obtido na rotina (quando se utiliza como volume inicial estabelecido pelo protocolo da técnica, ou seja, 1000µL):

Grupo 1 (G1): 153 amostras com carga viral plasmática inferior ao limite de detecção da técnica (50 cópias de RNA/mL).

Grupo 2 (G2): 177 amostras com carga viral plasmática entre 50 e 1.000 cópias de RNA/mL.

Grupo 3 (G3): 57 amostras com carga viral plasmática entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA/mL.

Grupo 4 (G4): 57 amostras com carga viral plasmática acima de 10.000 e 100.000 cópias de RNA/ml.

Grupo 5 (G5): 57 amostras com carga viral plasmática acima de 100.000 cópias de RNA/ml.

As amostras foram processadas em triplicada utilizando volumes iniciais de 1000µL (rotina), 500µL e 200µL. Depois de uma análise inicial, houve a necessidade de ampliar a amostragem nos grupos 1 e 2. Neste sentido, foram incluídas 200 amostras em G1 e G2, respectivamente. Para esta segunda fase do estudo, quando o volume inicial era inferior ao preconizado pela técnica o mesmo foi completado utilizando-se plasma humano negativo para o HIV com sorologia confirmada por biologia molecular.

Metodologia

A metodologia utilizada foi o *Branched-DNA* (b-DNA) na forma do kit comercial *Quantiplex HIV QT Assay*, *Siemens*®, segundo as especificações do fabricante.

Resultados e Discussão

Pelos resultados obtidos (Tabela 4), quando se considera diferença significativa uma diferença maior que 0,5 log, pode-se notar que em 93,0% dos casos (466 amostras) houve concordância entre os resultados independente do *input* inicial de plasma utilizado.

No entanto, em 26 casos observou-se discrepância nos resultados obtidos quando se compara o *input* inicial de 1000 μ L (padrão) com a utilização de um volume inicial de amostra inferior ao preconizado pela técnica (200 μ L e/ou 500 μ L).

Para a realização desta análise os valores obtidos, quando o *input* inicial não foi o preconizado pela técnica, foram corrigidos multiplicando-se os resultados, em cópias de RNA/mL, pelos fatores de correção 5 e 2 para os volumes iniciais de 200 μ L e 500 μ L, respectivamente. A partir dos valores obtidos em cópias de RNA/mL o logaritmo decimal foi calculado e, este comparado com a carga viral obtida quando se utilizou 1000 μ L.

O resultado desta análise mostra que nos grupos com carga viral plasmática superior a 10.000 cópias de RNA/mL (G4 e G5) nenhuma amostra foi discrepante, o que sugere que para cargas virais elevadas existe equivalência no resultado independente do *input* inicial utilizado (1000 μ L, 500 μ L ou 200 μ L).

No entanto, quando se observa o resultado obtido nos grupos com carga viral inferior a 10.000 cópias de RNA/mL (G1, G2 e G3) diferenças foram observadas.

Tabela 4: Distribuição dos valores concordantes e discordantes por Grupo estudado. G1: amostras com Carga Viral Plasmática (CVP) inferior ao limite de detecção da técnica (50 cópias de RNA/mL); G2: amostras com CVP entre 50 e 1.000 cópias de RNA/mL; G3: amostras com CVP entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA/mL; G4: amostras com CVP entre 10.000 e 100.000 cópias de RNA/mL e G5: amostras com CVP acima de 100.000 cópias de RNA/mL.

	Concordância	Discordância	Total
G1	145	8	153
G2	152	25	177
G3	55	2	57
G4	57	0	57
G5	57	0	57
Total	466	35	501

Para avaliar o significado desta discordância cada grupo foi analisado individualmente. A tabela 5 mostra os resultados obtidos quando a carga viral foi indetectável com o *input* inicial de 1000 μ L.

Tabela 05: Concordância dos resultados utilizando os volumes iniciais de 200µL e 500µL, quando se considera amostras com carga viral indetectável (G1).

<i>Amostra</i>	<i>200µl</i>	<i>500µl</i>
Concordantes	148	150
Discordantes	5	3
Total	153	153

Pela análise da tabela 5 nota-se que amostras com carga viral indetectável, testadas com 200µL e 500µL, apresentaram discordância de 5 amostras para 200µL e 3 amostras para 500µL, sendo que as amostras discordantes mostraram resultados de carga viral superiores ao esperado. No entanto, a análise neste grupo é difícil, pois mesmo amostras com diferenças inferiores a 0,5 log são consideradas discordantes quando esta diferença conduz a uma carga viral detectável, o que implica, em modificações da conduta clínica.

Tabela 06: Concordância dos resultados utilizando os volumes iniciais de 200µL e 500µL, quando se considera amostras com carga viral entre 50 a 1.000 cópias de RNA/ml (G2).

<i>Amostra</i>	<i>200µl</i>	<i>500µl</i>
Concordantes	161	163
Discordantes	16	14
Total	177	177

Tabela 07: Concordância dos resultados utilizando os volumes iniciais de 200µL e 500µL, quando se considera amostras com carga viral entre 1.000 a 10.000 cópias de RNA/ml (G3)

Amostra	200µl	500µl
Concordantes	55	55
Discordantes	2	2
Total	57	57

Quando se consideram amostras com carga viral entre 50 e 1.000 cópias de RNA/mL (Tabela 6) notam-se discordâncias em número mais elevado de amostras, sendo 16 amostras discordantes para 200µL e 14 para 500µL.

Os testes realizados em amostras de carga viral na faixa de 1.000 até 10.000 cópias de RNA/mL (Tabela 7) mostraram uma queda no número de amostras discordantes, duas amostras discordantes para 200µL e, também, duas amostras discordantes para 500µL. As amostras discordantes apresentavam carga viral entre 3 e 4 log.

Pelos resultados observados (Tabelas 4, 5, 6 e 7) nota-se que quanto maior é a carga viral, menor é o número de discordâncias e que, as discrepâncias podem comprometer o resultado do exame.

No entanto, para comprovar se a utilização de um volume inferior de plasma como *input* inicial para o exame pode estar interferindo no resultado, nova amostragem foi realizada, na qual foram incluídas 200 amostras com carga viral inferior entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA/mL, sendo 100 amostras no grupo 2 e 100 no grupo 3. Para o processamento destas amostras utilizou-se um volume inicial de plasma de 200µL e, para se garantir o *input* de 1000µL o volume foi completado com 800µL de plasma negativo para o HIV, por técnicas moleculares.

Os resultados obtidos para G2 e G3 estão expressos nas tabelas 08 e 09 respectivamente.

Tabela 08: Concordância dos resultados utilizando o volume inicial de 200µL, quando se considera amostras com carga viral entre 50 a 1.000 cópias de RNA/ml (G2).

<i>Amostra</i>	<i>200µl</i>
Concordantes	65
Discordantes	35
Total	100

Pela análise da tabela 08 nota-se que 35 amostras apresentaram resultados discordantes, sendo que, destas 29 amostras com carga viral detectável, mas inferior a 300 cópias de RNA/mL, passaram a ser indetectáveis quando testadas com o volume inicial de 200µL e, sugerindo uma alteração significativa do ponto de vista clínico, já que este resultado implica na mudança de faixa da carga viral de detectável para indetectável.

Tabela 09: Concordância dos resultados utilizando o volume inicial de 200µL, quando se considera amostras com carga viral entre 1.000 a 10.000 cópias de RNA/ml (G3).

<i>Amostra</i>	<i>200µl</i>
Concordantes	98
Discordantes	2
Total	100

Pela análise da tabela 09 nota-se que embora ainda tenham existido resultados discordantes o número de discordância foi muito menor quando comparado a G1 (tabela 08), corroborando os achados anteriores de que a medida que a carga viral cai a discrepância entre o resultado obtido quando se utiliza 1000 μ L e 200 μ L se eleva.

Os resultados aqui encontrados sugerem que a discrepância de resultados obtidos quando se utiliza um volume inicial de amostra inferior ao recomendado pela técnica se eleva à medida que a carga viral cai. Assim, deve-se considerar que na indisponibilidade do volume ideal (1000 μ L) poder-se-ia trabalhar com volumes inferiores desde que se altere o limite de detecção inferior da metodologia, pois a redução do *input* inicial de plasma gera uma perda de sensibilidade do método.

A análise dos dados obtidos no grupo 2 (carga viral entre 50 e 1.000 cópias de RNA/mL) mostra que é nesta faixa que está o maior índice de discrepância de resultados quando se utiliza um volume inicial de plasma inferior a 1000 μ L. No entanto, quando se considera os dados dentro deste grupo individualmente nota-se que a elevação do limite de detecção inferior da técnica para 400 cópias de RNA/mL reduz o número de resultados discrepantes, sugerindo que esta alteração de limite de detecção pode ser considerada diante da indisponibilidade de volume suficiente de plasma. Esta alteração de limite de detecção seria coerente na prática, uma vez que a metodologia RT-PCR (Roche), de limite de detecção de 400 cópias de RNA/mL vinha sendo utilizada em alguns laboratórios do país da Rede Nacional de Carga Viral até 2006, além do fato que a referida metodologia é considerada padrão ouro internacionalmente (Sun et al., 1998).

Neste sentido, é importante considerar que a dinâmica da infecção do HIV na criança é diferente da observada no adulto. A criança apresenta cargas virais elevadas, ou seja, maiores que um milhão de cópias de RNA/mL no início da vida, com taxas de declínio mais lentas do que as apresentadas em adultos. A definição de prognóstico na criança é analisada principalmente pela contagem de células T-CD4 e evolução clínica de cada paciente. Nas crianças com idade superior a 30 meses, os dados de literatura indicam que níveis de viremia plasmática superiores a 100.000 cópias de RNA/mL e contagem de linfócitos T CD4 inferior a 15% são preditores independentes de risco aumentado para progressão clínica ou morte

(Brasil, 2004). Assim, se houver necessidade a alteração do limite de detecção para 400 cópias de RNA/mL não seria significativa sob o ponto de vista clínico e tornaria possível a utilização de volumes iniciais inferiores a 1000 μ L, permitindo o processamento de amostras, que atualmente representam uma dificuldade prática.

Situações similares já são bem documentadas na literatura para a metodologia NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) e, mais recentemente a PCR em tempo real (Abbott, 2007).

***Avaliação do desempenho das
plataformas System 340 Analyzer e
Versant™ 440 Molecular System na
rotina da determinação da carga viral
plasmática do HIV-1 pelo b-DNA***

Casuística

Para avaliar o desempenho das plataformas *System 340 Analyzer* e *Versant™ 440 Molecular System* pela metodologia do b-DNA, foram utilizadas 45 amostras de pacientes com solicitação médica para o exame de carga viral plasmática do HIV-1, o qual foi realizado paralelamente nas duas plataformas.

Metodologia

A metodologia utilizada foi o *Branched-DNA* (b-DNA) na forma do kit comercial *Quantiplex HIV QT Assay*, *Siemens®*, segundo as especificações do fabricante.

O *b*-DNA ou DNA ramificado é uma metodologia de amplificação de sinal luminescente que utiliza um conjunto de sondas para quantificar diretamente o RNA viral do HIV no plasma humano. Atualmente, a detecção do sinal luminescente é automatizada e desempenhada na plataforma *System 340 Analyzer*. O *Versant™ 440 Molecular System* é uma atualização da plataforma, desenhado para automação da maioria dos passos do ensaio (Hanson et al., 2008).

Os resultados obtidos na comparação das duas plataformas estão na tabela 10. Foram considerados concordantes resultados com diferença igual ou inferior a 0,5 log (BRASIL, 2000).

Tabela 10: Resultados obtidos com o processamento das amostras nas plataformas *System 340 Analyzer* e *Versant™ 440 Molecular System*

<i>Amostras</i>	<i>System 340</i>	<i>Versant 440</i>
Concordante	45	45
Discordantes	0	0
Total	45	45

Pela análise da tabela 10 nota-se que a concordância de resultados foi de 100%. Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com estudos anteriores, que demonstraram precisão, linearidade, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade analíticas quando amostras foram processadas utilizando o *Versant™ 440 Molecular System* (Hanson et al., 2008).

Embora, as duas plataformas tenham mostrado resultados concordantes existem outros fatores na rotina diária que devem ser considerados no momento da opção pela plataforma a ser utilizada, como tempo de execução de cada fase, manutenção, preparação do equipamento entre outros.

Desta forma, pela análise da tabela 11 percebe-se que a utilização da plataforma *Versant™ 440 Molecular System* implica em um maior período de tempo tanto para as manutenções requeridas para a rotina, quanto para a execução do exame. Esta diferença de tempo entre as duas plataformas ocorre devido ao número de agulhas do pente de manipulação, enquanto o *System 340 Analyzer* apresenta seis agulhas, o *Versant™ 440 Molecular System* conta com apenas uma para realizar os mesmos procedimentos.

Por outro lado, a plataforma 440 não exige manipulação manual durante um dia inteiro (segundo dia de rotina), pois a preparação das soluções bem como todas as pipetagens são automatizadas; o que liberaria o técnico para outras atividades, como o cadastramento ou liberação de rotinas.

Tabela 11: Resultados do tempo demandado para cada operação nas duas plataformas, *System 340* e *Versant 440*.

Atividade	Tempo (minutos)	
	<i>System 340</i>	<i>Versant 440</i>
Manutenção Semanal	25	33
Manutenção Diária (pré-ensaio)	10	58
Manutenção Mensal	13	17
Procedimento 1 placa	19h41	21h19
Procedimento 2 placas	20h	25h05

A manutenção semanal consiste em descontaminar os componentes interiores, os recipientes de lavagem e de resíduos com uma solução de hipoclorito a 0,2% (*Clean System*).

A manutenção diária (pré-ensaio) consiste em uma conferência do painel, do detector, e verificação da aspiração e dispensação das agulhas utilizando água ultrapura (*Performance Checks*) . Neste procedimento, o *Versant 440* verifica, ainda, o volume dos reagentes do módulo de fluídos e, confere o desempenho da sonda de reagentes, procedimentos que, para o *Systems 340* devem ser realizados pelo próprio operador.

A manutenção mensal consiste em verificar o tampão de compressão da cabeça do leitor, teste de *background* (leitura da placa de reação vazia, ou seja, este teste controla a contaminação) e a limpeza do filtro de ar.

Desta forma, embora as plataformas tenham demonstrado a mesma eficiência e precisão na obtenção dos resultados, a opção do laboratório pela utilização da plataforma de detecção se encontra na dependência de fatores diversos e, para esta opção deve ser considerada a realidade local de cada serviço.

***Estudo de Equivalência dos três ensaios
para a quantificação do RNA plasmático
do HIV-1***

Casuística

Foram incluídos nesse estudo amostras de plasma estocadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina - UNESP, provenientes de pacientes soropositivos para o HIV-1 selecionados ao acaso, maiores de 18 anos, sem distinção de raça e sexo, com solicitação médica para realização do exame de carga viral plasmática, selecionados randomicamente. Todos os pacientes pertencem as Direções Regionais de Saúde de Bauru, Botucatu, Assis e Marília.

Para a comparação das três metodologias já utilizadas na Rede Nacional de Laboratórios de Carga Viral as amostras de plasma dos pacientes foram subdivididas em dois grupos:

Grupo 1 (G1): 215 amostras com carga viral plasmática superior a 400 cópias de RNA/mL pelo RT-PCR (método de referência). Neste grupo, as três metodologias foram avaliadas.

Grupo 2 (G2): 207 amostras com carga viral plasmática inferior a 400 cópias de RNA/mL. Neste grupo, apenas o TMA e o b-DNA foram avaliados, já que o limite inferior de detecção para o RT-PCR é 400 cópias de RNA/mL.

Metodologia

Para a comparação das três metodologias já utilizadas na Rede Nacional de Carga Viral, a determinação da carga viral plasmática foi realizada utilizando o *Quantiplex HIV QT Assay, Siemens®*, versão 3.0, *Nuclisens HIV 1 QT Assay, BioMeriex®*, versão 2.0 e *Amplicor HIV 1 Monitor Test, Roche®*, versão 1.5.

Todos os testes foram realizados segundo as especificações do fabricante para cada método.

Pelos resultados obtidos (Tabela 12, 13 e 14) pode-se notar certa discrepância entre o *Amplicor* e os demais métodos. Quando se confronta a carga viral plasmática obtida pelo *Nuclisens* e *Quantiplex* nota-se que, apenas, 20 amostras são discordantes, contra 42 e 40 na comparação *Quantiplex X Amplicor* e *Amplicor X Nuclisens*, respectivamente.

Tabela 12: Distribuição dos valores de Carga Viral Plasmática segundo *Quantiplex X Nuclisens*

	<i>Nuclisens</i>		<i>Total</i>
<i>Quantiplex</i>	< 79	≥ 79	
< 49	160	9	169
≥ 49	11	242	253
Total	171	251	422

Tabela 13: Distribuição dos valores de Carga Viral Plasmática segundo *Quantiplex X Amplicor*

	<i>Amplicor</i>		<i>Total</i>
<i>Quantiplex</i> x	< 399	≥ 399	
< 49	167	2	169
≥ 49	40	213	253
Total	207	215	422

Tabela 14: Distribuição dos valores de Carga Viral Plasmática segundo
Amplicor X Nuclisens

Amplicor	Nuclisens		Total
	< 79	≥ 79	
< 399	169	38	207
≥ 399	2	213	215
Total	171	251	422

Para avaliar o significado da discordância dos resultados o teste não paramétrico de Mc Nemar foi realizado para os binômios Quantiplex X Nuclisens, Quantiplex X Amplicor e Amplicor X Nuclisens, o qual revelou uma distribuição de qui-quadrado de 0,05 ($p > 0,05$), 32,59 ($p < 0,0001$) e 30,63 ($p < 0,0001$) respectivamente, evidenciando que houve diferença estatisticamente significativa quando o Amplicor estava envolvido.

No entanto, este resultado pode ter ocorrido devido ao fato de que para o Amplicor o limite inferior de detecção é de 400 cópias de RNA/mL, muito mais alto que os demais (50 cópias de RNA/mL para o Quantiplex e 80 para o Nuclisens). Assim, resultados indetectáveis pelo Amplicor poderiam ainda se manter acima do limite de detecção quando quantificados pelas demais metodologias. Desta forma, surgiu a necessidade de dividir a amostra em dois grupos:

Grupo 1 (G1): 215 amostras com carga viral plasmática superior a 400 cópias de RNA/mL pelo Amplicor (método de referência). Neste grupo, as três metodologias foram avaliadas.

Grupo 2 (G2): 207 amostras com carga viral plasmática inferior a 400 cópias de RNA/mL. Neste grupo, apenas o Nuclisens e o Quantiplex foram avaliados, já que o limite inferior de detecção para o Amplicor é 400 cópias de RNA/mL.

Diante desta nova distribuição dos dados, uma análise estatística foi conduzida e revelou uma tendência à discrepância das metodologias tanto no grupo 1 (Tabela 15) quanto no grupo 2 (Tabela 16).

Tabela 15: Medidas descritivas e resultado do teste estatístico obtido para o Grupo 1 (G1): Amostras com carga viral plasmática superior a 400 cópias de RNA/mL

Medida Descritiva	<i>Quantiplex</i>	<i>Amplicor</i>	<i>Nuclisen</i>	Resultado do Teste Estatístico (p-value)
Menor Valor	1,70	2,60	1,90	
Primeiro Quartil	3,50	3,80	3,80	
Mediana	4,20	4,50	4,40	p< 0,001
Terceiro Quartil	4,70	5,10	4,80	
Maior Valor	6,40	5,90	6,50	
Média	4,119	4,473	4,267	
Desvio Padrão	0,908	0,853	0,897	

A análise da tabela 15 mostra que as três metodologias apresentam resultados discrepantes para valores de carga viral plasmática superiores a 400 cópias de RNA/mL. Pela análise da mediana observa-se que tanto o Quantiplex quanto o TMA, no geral, evidenciam resultados inferiores aos obtidos com o Amplicor ($p<0,001$), no entanto, quando se leva em conta que a diferença observada mesmo sendo estatisticamente significativa não ultrapassa 0,2-0,3 log, faixa que vem sendo considerada não significativa do ponto de vista clínico. Por outro lado, quando se realiza uma análise mais minuciosa, caso a caso, dentro deste grupo observa-se que nas amostras discrepantes o Quantiplex forneceu resultados ligeiramente inferiores ao Amplicor, o que já vem sendo observado em outros estudos (HOLMES e DAVIS e HEATH, 2003), e o Nuclisens apresentou resultados

ligeiramente superiores, na maioria dos pontos discrepantes, embora resultados inferiores também tenham sido observados.

Tabela 16: Medidas descritivas e resultado do teste estatístico obtido para o Grupo 2 (G2): Amostras com carga viral plasmática superior a 400 cópias de RNA/mL

Medida Descritiva	Quantiplex x	Nuclisen s	Resultado do Teste Estatístico (p-value)
Menor Valor	1,70	1,90	
Primeiro Quartil	1,70	1,90	
Mediana	1,70	1,90	p< 0,001
Terceiro Quartil	1,70	1,90	
Maior Valor	4,90	5,00	
Média	1,805	2,019	
Desvio Padrão	0,322	0,357	

A análise da tabela 16 evidencia informação similar a anteriormente na comparação do *Quantiplex* com o *Nuclisens*. A mediana dos resultados obtida com os resultados do *Quantiplex* apresenta-se inferior, no geral, a obtida com o *Nuclisens* ($p < 0,001$), no entanto, quando se leva em conta que a diferença observada corresponde aos limites inferiores de detecção de cada método, apesar de estatisticamente significativa tal diferença não é relevante do ponto de vista clínico. Na análise caso a caso, os resultados se mostram mais concordantes do que no grupo 1 e, quando diferença maior que 0,3 log é observado os valores obtidos com o *Nuclisens* são mais elevados do que os resultados do *Quantiplex*.

Neste contexto, os resultados discrepantes entre os métodos devem ser analisados criteriosamente. A não equivalência pode estar associada ao subtipo de HIV circulante no paciente, parâmetro que não pode ser avaliado por este estudo já que os subtipos não foram determinados. Estudos vêm demonstrando que o Amplicor apresenta boa concordância de resultados, sendo considerado o teste de referência, enquanto o *Quantiplex* vem apresentando resultados ligeiramente inferiores (0,3-0,4 log), mas não clinicamente significativos. O *Nuclisens* vem demonstrando resultados menos consistentes que os demais, o subtipo G e o grupo N não têm sido detectados por este método e o subtipo F ou não é detectado ou apresenta resultados muito inferiores aos demais (HOLMES e DAVIS e HEATH, 2003).

Com a crescente variabilidade genética do HIV-1 é de extrema importância que as metodologias de quantificação do RNA do HIV-1 sejam periodicamente monitoradas a fim de que estejam sempre disponíveis ensaios que quantifiquem as diferentes variantes do HIV-1 com eficiência, exatidão e reprodutibilidade.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Citocinas. In: **Imunologia: celular e molecular**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. cap.12, p.253-76.

ABBOTT MOLECULAR. **Abbott's HIV-1 Viral Load Test Approved by FDA for Use on New m200 Molecular Diagnostics Instrument**. Illinois, 2007.

Disponível em:

<http://www.abbottmolecular.com/AbbottsHIV1ViralLoadTestApprovedbyFDAforUseonNewm200MolecularDiagnosticsInstrument_4117.asp>. Acesso em: 20 Out. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Unidade de Assistência. **AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento**. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/assistencia/etiologia_diagnostico.htm>. Acesso em: 16 Nov. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Contagem de células T CD4 e testes de carga viral: principais marcadores laboratoriais para indicação e monitorização do tratamento antiretroviral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/assistencial/textom.html>>. Acesso em: 19 Fev. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acompanhamento da Rede Nacional de Laboratórios de CD4+/CD8+**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISA5935B3CPTBRI.E.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Brasília. **O que é HIV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISF86565C9PTBRIE.htm>>. Acesso em: 17 Ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **AIDS vinte anos: esboço histórico para entender o programa brasileiro**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br//data/Page/LUMISBD1B398DITEMIDCF21498585DB4D9F8F812B75B92305DAPTBRIE.htm>>. Acesso em: 10 Jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico e acompanhamento da Rede Nacional dos Laboratórios de Carga Viral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS47A3618FPTBRIE.htm>>. Acesso em: 12 Ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acompanhamento da Rede Nacional de laboratórios de Carga viral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS47A3618FPTBRIE.htm>>. Acesso em: 15 Ago. 2009.

BRASIL. Ministério dos Transportes. **Distâncias entre cidades**. Brasília: Ministérios dos Transportes, 2008. Disponível em:

<<http://www.transportes.gov.br/bit/inrodo.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Distribuição de reagentes aos estados da Rede Nacional dos Laboratórios de Carga Viral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BOD64528E-075F-4F85-BAOF-6225492C7E33%7.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

Versant HIV-1 RNA 3.0 bDNA. Deerfield, IL: Siemens, 2007. Bula de remédio.

DIAZ, R. Estado de alerta. *Pesq. Fapesp*, v. 78, p. 46-9, 2002.

FAN, H.; HEGDE, P.S. The transcriptome in blood: challengers and solutions for robust expression profiling. **Curr. Mol. Med.**, v.5, p.3-10, 2005.

GINOCCHIO, C.C. et al. Comparison of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma as measured by the Nuclisens nucleic acid sequence-based amplification and Quantiplex branched-DNA assays. **J Clin Microbiol.**, v.37, p.1210-1212, 1998.

GURTLER, L.G. et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameron. **J. Virol.**, v.68, p.1581-1585, 1994.

HANSON J.C. et al. Multicenter Evaluation of the Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay [bDNA] with the Versant™440 Molecular System. **Siemens Healthcare Diagnostics Inc.**, Tarrytown: 2008.

HOLMES, H.C.; DAVIS, C.L.; HEATH, A.B. **Report of an International Collaborative Study to Evaluate a WHO HIV-1 RNA Genotype Reference Panel**. Geneve: World Health Organization, 2003.

LIN, H. J.; PEDNEAULT, L.; HOLLINGER, F.B. Intra-assay performance characteristics of five assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. **J Clin Microbiol.** ,v.27, p. 835-839, 1998.

MELLORS, J.W. et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, v.272, p.1167-1170, 1996.

MULDER, J. et al. Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. **J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retroviol.** v. 8, p. 446-454, 1994.

MURPHY, D.G. et al. 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, p. 4034-4041, 2000.

NOLTE, F.S. et al. Clinical comparison of an enhanced-sensitivity branched-DNA assay and reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. **J. Clin. Microbiol.** V.36, p. 716-720, 1998.

PACHL, C. et al. Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. **J. Acquired. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retroviol.**, v.8, p. 446-454, 1995.

QIAGEN. Sample e Assay Technologies. 2009. Disponível em: <<http://www1.qiagen.com/Products/RnaStabilizationPurification/mRNAPurification.aspx>> Acesso em: 12 Jan. 2009.

SAWYER, L. et al. Laboratory validation of a semi-automated, quantitative HIV-1 In: bDNA assay with a reporting threshold of 50 copies/ml. 38 Interscience **Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 38., 1998. p. 24-27.

SCHUURMAN, R. et al. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3016-3022, 1996.

SIEMENS. **Manual de carga viral HIV-1.** Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

SUN, R. et al. Ultrasensitive reverse transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 2964-2969, 1998.

TAVEIRA, N.; BARTOLO, I.; BARROSO, H. **Papel do vírus recombinante na epidemiologia da infecção pelo HIV.** Lisboa: Faculdade de Farmácia de Lisboa, 2002.

Disponível em:

<<http://www.aidscongress.net/article.php?sid=50>> Acesso em: 10 Ago. 2009.

TILLER, F.W. et al. **Biologia molecular em virologia.** Rio de Janeiro: Instituto Estadual Hematologia "Arthur S. Cavalcanti", 1997.

VAN, GEMEN, B. et al. Quantification of HIV 1 RNA in plasma using NASBA during HIV 1 primary infection. **J. Virol. Methods**, v. 43, p. 177-188, 1993.