



**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE  
COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST E AIDS**

Brasília/DF, 06 de fevereiro de 2002.

**Ofício circular nº 040/ 02 – UDAT (LAB)/ CN DST e AIDS/ SPS/ MS**

Prezado(a) Senhor(a),

Encaminhamos anexo, Nota Técnica a respeito dos novos testes para a quantificação da Carga Viral do HIV-1, disponíveis na Ata de Registro de Preço do Ministério da Saúde.

Preso ao exposto.

Atenciosamente,

  
**Josué N. de Lima**  
Assessor Responsável

Unidade de Diagnóstico Assistência e Tratamento  
CN DST e AIDS/ SPS/MS

Às Coordenações Estaduais de DST/Aids  
Às Coordenações Municipais de DST/Aids  
Às Secretarias Estaduais de Saúde  
À Rede Nacional de Carga Viral  
ONGs Aids e Sociedades Civas



**NOTA TÉCNICA**  
**METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HIV-1**  
**DISPONÍVEIS NA ATA DE REGISTRO DE PREÇO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE**

*Vários métodos moleculares de quantificação da carga viral do HIV-1 foram desenvolvidos e introduzidos na prática clínica a partir de 1996, possibilitando uma maior acurácia no monitoramento do indivíduo infectado pelo HIV. Desde então sabia-se que era necessário uma escala de conversão entre as metodologias disponíveis para quantificação da carga viral. Esse conceito vem sendo reformulado, uma vez que as novas versões dos kits permitem comparação direta entre os resultados.*

**1. MENSURAÇÃO QUANTITATIVA DO HIV-1**

Alguns dos métodos disponíveis e rotineiramente utilizados para detecção e quantificação do RNA do HIV-1 no plasma são:

- NucliSens<sup>®</sup> HIV-1 QT (BioMérieux) – amplificação de ácido nucleico baseado em seqüência (NASBA);
- b-DNA HIV-1 – RNA v. 3.0 (Bayer Diagnostics)- amplificação de sinal através da técnica de sonda ramificada para o ácido nucleico
- Amplicor HIV-1 Monitor v.1.5 (Roche Molecular Systems, Inc.) – reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR);

As três metodologias citadas encontram-se disponíveis para a Rede Nacional de Carga Viral e são descritas a seguir:

### 1.1 AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO BASEADO EM SEQUÊNCIA (NASBA)

Este sistema envolve o isolamento do ácido nucleico por lise e sua ligação à partículas de sílica, seguida de amplificação isotérmica usando transcriptase reversa (RT), RNAase H e T7 RNA polimerase. Para quantificação do ácido nucleico amplificado são utilizados três níveis de calibradores (controles internos), seguido de um sistema de detecção por eletroquimioluminescência.

A reprodutibilidade do método situa-se em torno de 0,3 log, com faixa dinâmica de detecção de 6 ordens logarítmicas de magnitude (40 a 10 milhões de cópias/mL) e o uso dos três controles internos (calibradores) acrescenta confiabilidade extra ao método. A quantidade de plasma a ser utilizado é de 1,0 mL, quando então, a faixa de sensibilidade situa-se entre 80 a 10.000.000 cópias/mL. Utilizando-se 2.0 mL de plasma, a sensibilidade aumenta para 40 cópias/mL. O plasma pode ser estocado a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise ou quando adicionado a um tampão de lise, mantém a amostra estável por 48 horas à temperatura ambiente ou 15 dias entre  $4-8^{\circ}\text{C}$ . (Nunca em temperaturas menores). Este procedimento facilita o transporte e estocagem, principalmente em locais que possuem poucos recursos para congelamento do material. A utilização de 1 mL de plasma, é uma quantidade relativamente grande, quando considera-se a coleta de amostra em crianças e/ou o uso em sorotecas para pesquisa científica.

### 1.2 DNA DE CADEIA RAMIFICADA (bDNA)

O DNA de cadeia ramificada (bDNA) é um método de hibridação tipo sanduíche, onde o RNA é capturado por um conjunto de sondas que ligam-se a diferentes regiões do RNA e em seguida, sondas marcadas com fosfatase alcalina hibridam-se a esse complexo imobilizado para ser posteriormente detectado por meio de reação com um substrato quimioluminescente.

A reprodutibilidade do método situa-se em torno de 0,3 log, com faixa dinâmica de detecção de 4 ordens logarítmicas de magnitude (50 a 500.000 cópias/mL). Utiliza-se 1,0mL de plasma, que deve ser mantido e transportado (quando necessário) a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise.

### 1.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DA TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

Esta metodologia é baseada em um sistema de amplificação que utiliza a tecnologia de RT-PCR, onde se utiliza uma enzima de ação dupla – transcrição reversa do RNA e amplificação da cadeia do DNA - com iniciadores (“primers”) biotinizados. Os produtos de PCR são capturados por sondas, seguido de detecção colorimétrica .

Nesta técnica é utilizado um calibrador interno, que é co-amplificado juntamente com a amostra e a relação da densidade óptica corresponderá tanto ao calibrador, quanto às amostras, sendo então utilizada para o cálculo do número de cópias por mL.

No sistema é incorporado um controle enzimático que evitar contaminação de amostras amplificadas. Este sistema enzimático degrada possíveis amplicons produzidos em reações anteriores.

A reprodutibilidade do método situa-se em torno de 0,3 log. A faixa dinâmica de detecção de 4 ordens logarítmicas de magnitude, é alcançada pelo uso combinado do teste ultra-sensível , com sensibilidade de 50 a 100.000 cópias/mL e do teste padrão, com faixa de sensibilidade de 500 a 750.000 cópias/mL..

## 2. CORRELAÇÃO QUANTITATIVA ENTRE AS METODOLOGIAS.

Existe grande interesse na determinação da correlação quantitativa entre as diferentes metodologias.

Neste momento, faz-se necessário o entendimento da correlação entre as três metodologias disponíveis para a Rede Nacional de Carga Viral, comercializadas pelas empresas Bayer, BioMerieux e Roche, conforme descrição anterior.

Em um estudo conduzido por Murphy e colaboradores foram analisadas 460 amostras clínicas, comparando os resultados obtidos pelas metodologias NASBA, Amplicor e bDNA, onde o resultado das três metodologias apresentam uma correlação extremamente significativa. Neste estudo, todos os métodos quantificaram de forma semelhante os isolados dos subtipos não B do HIV-1.

Outro estudo conduzido no Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP, em colaboração com o Laboratório de Virologia Molecular e Animal da UFRJ, avaliou 67 amostras brasileiras e um painel de amostras africanas do subtipo A-G, com intuito de se determinar um fator de correlação entre os resultados das três metodologias citadas (dados não publicados). Este estudo difere dos anteriores por ter testado amostras provenientes de sobrenadantes de culturas de HIV-1 previamente quantificadas por p24 e microscopia eletrônica, apresentado 50.0000 cópias/mL. Os resultados mostraram que a reprodutibilidade foi semelhante em todas as metodologias, e de uma maneira geral, a correlação entre elas foi mantida. Estes dados sugerem que não há necessidade da aplicação de um fator de correção por ocasião do uso alternado entre as metodologias.

### **3. SENSIBILIDADE AOS DIFERENTES SUBTIPOS DO HIV-1**

Os primeiros estudos usando versões mais antigas do Amplicor, indicavam que esta metodologia apresentava baixa sensibilidade na detecção dos subtipos A, F e D. Tal fato não mais se verifica. Este problema foi bastante eliminado nas versões mais modernas do kit e novos estudos relatam a quantificação eficiente de isolados dos subtipos não B. Um outro estudo também indicou que o NASBA substituiria a quantificação de amostras dos subtipos G e H. Estudos recentes sugerem que o bDNA provavelmente quantifique todos os subtipos de forma bastante acurada.

#### 4. CONCLUSÕES

- Considerando as novas versões dos kits para quantificação de carga viral bDNA HIV-1 - RNA versão 3.0; Amplicor HIV-1 Monitor v.1.5 e NucliSens<sup>®</sup> HIV-1 QT A especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade das três metodologias citadas são boas e comparáveis.
- Não há necessidade do uso de fator de correção entre as três metodologias por ocasião do uso alternado dos testes. Isto se deve ao fato da reprodutibilidade entre os testes encontrar-se sempre abaixo de 0,5 log.
- No geral, as três metodologias apresentam boa sensibilidade na detecção de subtipos não B. Existe entretanto uma recomendação teórica para que se tenha especial atenção na quantificação de RNA do HIV-1 de indivíduos infectados por subtipos não B.
- As recomendações são aplicadas às novas versões dos kits descritos nesta nota técnica. Salientamos que para os Laboratórios da Rede Nacional de Carga Viral (serviço público), serão adquiridos estes kits. Caso algum paciente apresente resultado de carga viral obtido por um kit distinto dos aqui mencionados, os resultados devem ser avaliados com cautela.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Busch, M.P.; Satten, G.A. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. 1997. *Am J Med.* **19**;102 (5B):117-24.
2. Munoz, A.; Wang, M.C.; Bass, S. *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. 1989. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol* **130** (3):530-9.
3. Munoz, A.; Kirby, A.J.; He, Y.D. *et al.* Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. 1995. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **15**;8 (5):496-505.
4. Ho, D.D. *et al.* Viral counts in HIV infection. 1996 *Science* **24**;272 (5265):1124-5.
5. Wei, X.; Ghosh, S.K.; Taylor, M.E. *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. 1995. *Nature* **12**;373 (6510):117-22.
6. Kievits, T.; Van Gemen, B.; van Strijp, D. *et al.* NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. 1991. *J Virol Methods* **35** (3):273-86.
7. Hendricks, D.A.; Stowe, B.J.; Hoo, B.S. *et al.* Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. 1995. *Am J Clin Pathol* **104** (5):537-46
8. Guidelines for Laboratory Test Result Reporting of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Ribonucleic Acid Determination. Nov 16, 2001 / 50 (RR20); 1-2.
9. Cao, Y.; Ho, D.D.; Todd, J. *et al.* Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma. 1997. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **14** (2):179-83.
10. Sun, R.; Ku, J.; Jayakar, H.; Kuo, J.C. *et al.* Ultrasensitive reverse transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. 1998. *J Clin Microbiol* **36** (10):2964-9.
11. Murphy, D.G.ç Côté, L.; Fauvel, M.; René, P and 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.* 2000 Nov; 38(11):4034-4041.

12. Alaeus, A.; Lilja, E.; Herman, S.; Spadore, J.; Wang, J. And Albert, J. Assay of plasma samples representing different HIV-1 genetic subtypes: an evaluation of new versions of the Amplicor HIV-1 monitor assay. 1999. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15: 889-894.
13. Michael, N.L.; Herman, S.A.; Kwok, S.; Dreyer, K *et al.* Development of calibrated viral load standards for group M subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and performance of an improved Amplicor HIV-1 Monitor test with isolates of diverse subtypes. 1999. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2557-2563.
14. Nkengasong, J.N.; Kalou, M.; Maurice, C.; Bile, C *et al.* Comparison of NucliSens and Amplicor Monitor assays for quantification of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) RNA in plasma of persons with HIV-1 subtype A infection in Abidjan, Côte d'Ivoire. 1999. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2495-2498.