

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**COMPARAÇÃO ENTRE BDNA E PCR NA DETECÇÃO DA CARGA
VIRAL DO HIV-1**

Daniela Ferreira Passos

Orientador: Prof^ª. Dra. Sandra Leistner Segal

Porto Alegre, novembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas –
Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar •
Tel.: 51 3308-5605 • Porto Alegre - RS - Brasil • ppgcm@ufrgs.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**COMPARAÇÃO ENTRE BDNA E PCR NA DETECÇÃO DA CARGA
VIRAL DO HIV-1**

Daniela Ferreira Passos

Orientador: Prof^a. Dra. Sandra Leistner Segal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, novembro de 2013

Dedicatória

Aos amores da minha vida Luís e Cecília.

Agradecimentos

Agradeço ao Luís pelo amor e companheirismo, por entreter a Cecília enquanto eu escrevia, por revisar e formatar textos.

Agradeço à minha pequena Cecília, meu “projeto paralelo”, sem o qual este estudo poderia ter ficado pronto mais cedo, mas sem o qual minha vida não estaria completa. Muito obrigada, querida, pela tua doçura, inocência e amor que me fizeram ver a vida de uma perspectiva completamente diferente.

Agradeço aos meus pais pelo amor e apoio durante toda a minha vida, principalmente quando eu mais precisei.

Agradeço à Ana, à Izabel e à Juliana por cuidarem da minha pequena para eu poder assistir aulas e à Vera e à Cris por cuidarem dela para eu poder escrever e revisar.

Agradeço à toda a minha família por serem tão queridos e me apoiarem sempre.

Agradeço à Sandra pela orientação, pela oportunidade e principalmente pela confiança.

Agradeço à minha amigona do peito Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado por ter me incentivado e me ajudado muito mesmo nos momento de desespero.

Agradeço à minha querida amiga Maria del Carmen por ter me apresentado o “mundo da carga viral” e me ensinado muito sobre ele.

Agradeço ao Kavin, meu amigo e colega no HIV/GUM Research Laboratory, por me ajudar no banco de dados, pela troca de ideias, revisão dos textos em inglês e pela amizade.

Agradeço ao Adrian meu chefe no HIV/GUM Research Laboratory pelas oportunidades, ensinamentos, revisão de textos, críticas construtivas e incentivo.

Agradeço à Dra Susan Fiscus e ao Dr Richard Harrigan por responderem minhas mensagens tão prontamente e pelas valiosíssimas conversas por email.

Agradeço à Marisane da Serviço de Comutação Bibliográfica pela boa vontade frente aos meus inúmeros pedidos.

Agradeço às estatísticas do GPPG Luciana e Aline por me ajudarem a enxergar meus dados com mais clareza e me apresentarem alternativas para analisá-los.

Aos meus colegas e professores pelo apoio durante o curso, a gravidez e amamentação.

“Coming back to where you started is not the same as never leaving”

(Terry Pratchett)

Resumo

Introdução: A AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) é caracterizada por uma disfunção grave no sistema imunológico causada por uma infecção por HIV (Human Immunodeficiency Virus). A quantificação da viremia (carga viral) é uma ferramenta muito útil no monitoramento dos pacientes infectados pelo HIV, sendo um marcador de progressão da doença e eficácia do tratamento. A estimativa incorreta da carga viral pode levar à decisão terapêutica equivocada, portanto métodos acurados de quantificação se fazem necessários. Diversas técnicas comerciais estão disponíveis para a quantificação da carga viral do HIV-1: a maioria destas se baseiam na detecção de ácidos nucléicos e outras na detecção de enzimas e antígenos. O grau de automação varia nas diferentes técnicas assim como os procedimentos de isolamento, amplificação e detecção. A correlação e a concordância entre estas técnicas têm sido estudadas e há relatos de discordância entre os valores de carga viral produzidos por diferentes métodos. O conhecimento sobre o efeito das variações entre as técnicas se faz necessário para assegurar a interpretação adequada dos resultados. A interpretação dos resultados correta é particularmente importante quando estes estão próximos a pontos de corte utilizados para definições de rebote viral e falha virológica.

Objetivos: O objetivo deste estudo é comparar as técnicas de PCR (Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0) e b-DNA (Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0) para quantificação do HIV-1.

Métodos: 1000 amostras recebidas no HIV/GUM Research Laboratory do Chelsea and Westminster Hospital para quantificação da carga viral do HIV-1 durante os meses de Dezembro de 2009 e Janeiro de 2010 foram testadas pelos métodos de PCR (Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0) e b-DNA (Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0).

Resultados: Uma superquantificação sistemática foi observada nos resultados testados por PCR. Esta superquantificação ficou evidente nos resultados entre 50 e 250 cópias. Uma concordância elevada foi observada na análise dos pontos de corte de 500 e 1000 cópias/mL. Uma correlação linear forte foi observada entre estas técnicas na análise das amostras que

obtiveram resultados dentro do limite comum de detecção de ambas as técnicas, porém o nível de concordância foi insatisfatório.

Conclusão:

A superquantificação observada nos resultados obtidos pelo Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 em relação ao bDNA Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 é provavelmente o resultado de uma sensibilidade aumentada desta técnica. Nós recomendamos cautela quando resultados de duas metodologias diferentes são comparados, especialmente quando se comparam metodologias convencionais com aquelas baseadas em PCR em tempo real.

PALAVRAS-CHAVE

carga viral –HIV-1 – monitoramento – PCR –bDNA

Abstract

Introduction: AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) is characterised by a severe immune dysfunction caused by the HIV (Human Immunodeficiency Virus). The HIV viral load quantification is an essential tool to monitor HIV-infected patients. The HIV quantification is a disease progression marker and it is a key indicator in treatment efficacy. Inaccurate viral RNA values may subsequently lead to inappropriate treatment decisions hence accurate quantification methods are necessary. Several different methodologies are available to quantify the HIV viral load: a number of them are based on nucleic acid detection and others in detection of enzymes and antigens. Automation is also variable among these methods in addition to differences in isolation, amplification and detection. Several studies have been carried out to evaluate their correlation and agreement and some have evidenced discordant viral load values assessed by different assays. The knowledge about these differences should be taken in to account when analysing viral load results, particularly when low-level viraemia is concerned or those close to endpoints employed for definition of virological failure.

Objectives: In this study, two methods to quantify viral load are evaluated: one is based on real-time PCR (AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0) and the other is based on branched-DNA technology (Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0).

Methods: 1000 plasma samples received at the HIV/GUM Research Laboratory within Chelsea and Westminster Hospital for HIV-1 viral load quantification between December 2009 and January 2010 were tested by both Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 and Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 methods.

Results: Results obtained show that Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 PCR systematically overquantifies the viral loads results when compared to bDNA Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0.

Conclusion: The overquantification by Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 over bDNA Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 is likely to be a result of its increased sensitivity. We

recommend caution when comparing results from different methodologies, especially when a conventional assay and a real-time PCR assay are concerned.

KEYWORDS

Viral load – HIV-1 – monitoring – PCR – bDNA

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura de uma partícula viral.	20
Figura 2. Estrutura genética do vírus HIV.....	21
Figura 3. Etapas do ciclo de replicação do vírus HIV	23
Figura 4. Curso da infecção pelo vírus HIV na ausência de terapia antiretroviral.....	27
Figura 5. Representação do curso de tratamento com antiretrovirais com relação à variações na viremia e contagem de células CD4+.	35

Lista de Abreviaturas

ACTG – AIDS Clinical Trials Group

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

ARV – Antiretroviral

AZT – Zidovudina trifosfato

CDC – *Centers for Disease Control*

d4T – 2',3'-didehidro-3'deoxitimidina

ddC – 2', 3'- dideoxicitidina

ddI – 2',3'- didesoxiinosina

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EIA – Ensaios imunoenzimáticos (*Enzyme immunoassay*)

FDA – *Food and Drug Administration*

HAART – Terapia Antiretroviral Altamente Ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HLA – Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)

LTR – Repetições Terminais Longas (*Long Terminal Repeats*)

NNRTI – Inibidor da Transcriptase Reversa Não Nucleosídicos (*Non-Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor*)

NRTI – Inibidor da Transcriptase Reversa Nucleosídicos (*Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PI – Inibidor de Protease (*Protease Inhibitor*)

RNA – Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)

RT – Transcriptase Reversa (*Reverse Transcriptase*)

SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simian Immunodeficiency Virus*)

TDM – Monitoramento Terapêutico de Medicamentos (*Therapeutic Drug Monitoring*)

Sumário

1 Introdução	15
2 Revisão da literatura	18
2.1 <i>Estrutura Genética Vírus HIV-1</i>	19
2.2 <i>Ciclo de replicação do vírus HIV</i>	22
2.3 <i>História natural da Infecção por HIV e progressão da doença</i>	26
2.4 <i>Transmissão</i>	26
2.5 <i>Fases da Infecção por HIV</i>	27
2.5.1 <i>Infecção primária</i>	28
2.5.2 <i>Infecção assintomática</i>	29
2.5.3 <i>Infecção sintomática</i>	29
2.6 <i>Patogênese do HIV</i>	30
2.7 <i>Diagnóstico da Infecção por HIV</i>	31
2.8 <i>Terapia Antiretroviral para HIV</i>	34
2.9 <i>Marcadores laboratoriais de progressão da doença</i>	36
2.10 <i>Monitoramento dos pacientes infectados pelo HIV</i>	37
3 Justificativa	40
4 Objetivos	43
4.1 <i>Objetivo principal</i>	43
4.2 <i>Objetivos secundários</i>	43
5 Referências bibliográficas	44
6 Artigos em inglês	52
6.1 <i>Artigo de Revisão da Literatura</i>	52
Abstract	52
Introduction	53
Viral Load Quantification	53
HIV viral load quantification assays	54
NAT Technologies	57
non-NAT technologies	60

Discussion.....	61
References	63
6.2 Artigo Científico	72
Abstract.....	72
Background.....	73
Methods	74
Results	74
Discussion.....	77
References	81
7 Considerações Finais	86
8 Anexos.....	88

1 Introdução

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome) é uma doença caracterizada por uma disfunção grave no sistema imunológico. O agente etiológico é um lentívirus, um vírus com um longo período de incubação, da família Retroviridae, que tem o genoma constituído por RNA. Este vírus é chamado de HIV (Human Immunodeficiency Virus) e, devido à similaridades na estrutura e no genoma, acredita-se que este seja derivado do SIV (Simian Immunodeficiency Virus) (1-2).

Os primeiros relatórios publicados sobre a doença que viria ser chamada de AIDS foram publicados em 1981 e descrevem um surto de infecções oportunistas não usuais - principalmente pneumonia por *Pneumocystis carinii* - e Sarcoma de Kaposi em um pequeno grupo de homens homossexuais nos Estados Unidos (3-4). Na época, não se poderia prever que esta doença se tornaria uma das maiores pandemias globais atingindo milhões de pessoas no mundo inteiro (5-6).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011, 34 milhões de pessoas vivem com HIV/AIDS no mundo (7-8) e, em 2010, cerca de 2.7 milhões de pessoas foram infectadas pela primeira vez com o vírus. Desde que a doença foi descoberta, estima-se que 30 milhões de pessoas morreram de AIDS e cerca de 1.8 milhões morrem a cada ano (9). Em 2012, mais de 9.7 milhões de pessoas estavam recebendo tratamento com antiretrovirais em países de baixa e média renda (10).

Existe um esforço global através de uma estratégia da UNAIDS para levar prevenção, diagnóstico, tratamento, cuidados e suporte para um número crescente de pessoas infectadas com HIV. Os objetivos desta iniciativa para 2015 são a redução de novas infecções, a eliminação de novas infecções em crianças, a redução da mortalidade por HIV e reduzir a mortalidade por tuberculose em pacientes com HIV (10).

À medida que os diversos aspectos da doença foram estudados tais como modo de transmissão e o agente etiológico, testes diagnósticos foram desenvolvidos e programas de prevenção foram implementados (5). O primeiro antiretroviral para o tratamento do HIV, o AZT (zidovudina), foi licenciado em 1987 (11).

A imunodeficiência grave com profunda supressão da imunidade celular foi identificada como a característica comum nos diferentes grupos de pacientes afetados pela doença (12). Uma redução da contagem de linfócitos T CD4+ e um aumento de linfócitos T CD8+ foram observados nestes pacientes (13-14).

Diversas hipóteses sobre a causa da AIDS surgiram no início dos anos 80, tais como fungos como agente etiológico, agentes químicos e auto-imunidade. Mas o aumento nos casos de pneumonia por *Pneumocystis* em portadores de hemofilia, o estudo da forma de transmissão da doença e o tropismo pelas células CD4+ levou à hipótese de que a doença seria causada por um vírus (12). Assim, dois grupos independentes passaram a tentar isolar o vírus até que em 1984, o vírus chamado de HIV foi aceito pela comunidade científica como o vírus causador da AIDS (15).

O próximo passo após a identificação do vírus foi desenvolver um teste diagnóstico (16), que foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1985. O desenvolvimento deste teste não somente permitiu que o sangue utilizado em transfusões sanguíneas fosse analisado, evitando a contaminação de muitas pessoas, mas também possibilitou o conhecimento da proporção de pessoas infectadas (17). O teste também teve um impacto no estudo da patogênese do HIV já que possibilitou a detecção do vírus em indivíduos assintomáticos e pode-se então observar o curso natural da infecção através do acompanhamento destes indivíduos (17)

Em 1986, um segundo vírus foi observado em pacientes com AIDS (18). Este vírus foi posteriormente chamado de HIV-2 e possui estrutura semelhante ao HIV-1, mas difere quanto aos seus genes acessórios e no peso molecular de suas proteínas. Ambos os vírus HIV têm o mesmo modo de transmissão e estão associados às infecções oportunistas. O HIV-1 muta mais rapidamente, é mais virulento e produz infecções que progridem mais rápido que o HIV-2. O HIV-2 ocorre predominantemente na África enquanto o HIV-1 apresenta distribuição mundial (1-2). Embora a imunodeficiência seja menos grave em HIV-2, ambos se replicam em células T CD4+ e são considerados patogênicos (2). Estudos posteriores revelaram que o HIV-2 é mais parecido com o SIV (19). A análise filogenética de outros lentivírus símios levou à conclusão de que o HIV é derivado do SIV (19).

O desenvolvimento de antiretrovirais para o tratamento do HIV reduziu drasticamente a mortalidade e representou um avanço sem precedentes na história da medicina (11). A

disponibilidade e a redução dos custos destas drogas, associados a um apoio financeiro internacional fez com que um número muito maior de pessoas tivessem acesso ao tratamento para HIV (5).

O AZT foi introduzido como tratamento para a AIDS em 1987, já o ddC (zalcitabina), o ddI (didanosina) e o d4T (stavudina) foram introduzidos no início dos anos 90. Porém os resultados produzidos não atingiram as expectativas (11). Em 1995, os resultados preliminares dos estudos DELTA (comparação entre AZT mais ddI ou ddC com monoterapia com AZT) e do ACTG 175 (combinação ou monoterapia com AZT, ddI ou ddC), sugeriram que a terapia combinada com dois análogos de nucleosídeos era mais eficaz que a monoterapia (11). Neste mesmo ano, foram introduzidos os inibidores de protease (PIs) e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos (NNRTIs), iniciando-se a era da terapia anti-retroviral potente (HAART). O resultado desta terapia foi uma melhora significativa na morbidade e mortalidade por HIV, reduzindo drasticamente a viremia no plasma de pacientes infectados (1-2, 20). Embora o número de antiretrovirais (ARV) sendo desenvolvidas aumente significativamente a cada ano, com muitos pacientes atingindo a supressão da replicação do vírus, a erradicação do HIV ainda não é possível e o manejo da terapia ainda permanece um grande desafio frente a fatores como resistência que o vírus adquire e à falta de aderência ao tratamento (2, 21).

2 Revisão da literatura

A revisão da sistematizada foi elaborada considerando-se todos os aspectos que deveriam ser apresentados como base para o entendimento da importância da epidemia da infecção por HIV e do papel da carga viral no monitoramento dos pacientes infectados.

Os sistemas de busca online utilizados foram o PubMed, Portal CAPES Periódicos e Google Acadêmico.

Os artigos científicos foram obtidos através do Portal CAPES Periódicos, do Serviço de Comutação Bibliográfica (COMUT) da Biblioteca Central da UFRGS ou por correspondência com o autor.

Foram utilizados como descritores: HIV AIDS - *epidemiology*; HIV - *lentivirus*; HIV - *pathogenesis*; HIV - *life cycle*; HIV *infection - natural history*; HIV - *diagnosis*; HIV - *treatment*; HIV - *antiretroviral therapy*; HIV - HAART; HIV *infection - monitoring*; HIV - *viral load assays*; HIV - *viral load quantification methodologies*; HIV - *viral load quantification methods*; HIV - *viral load quantification techniques*; HIV - *comparison - viral load quantification*; HIV - *correlation - viral load quantification*; HIV - PCR; HIV - bDNA; HIV- NASBA; HIV - bDNA - PCR – NASBA; HIV - TaqMan 2.0 e HIV – bDNA 3.0.

2.1 Estrutura Genética Vírus HIV-1

O HIV-1 e o HIV-2 são retrovírus da família dos lentivírus, que usualmente causam infecções crônicas com longos períodos de latência e geralmente envolvem o sistema nervoso central. A família dos lentivírus é conhecida por sua persistência indefinida nos macrófagos ou em órgãos como o cérebro (santuários virais), por se esquivar das defesas do hospedeiro através de mecanismos como mudança de antígenos e neutralização de anticorpos, tornando a elaboração de vacinas um grande desafio (22-23). Lentivírus infectam também ovelhas (Visna), macacos (SIV), felinos (Feline Immunodeficiency Vírus), gado, e cavalos (11, 22-23).

O vírus HIV possui várias características genômicas, filogenéticas e epidemiológicas iguais ao SIV, o que sugere que ele seja derivado do SIV (24). A idéia de transmissão entre espécies é largamente aceita e provavelmente ocorreu através da caça e do manuseio de carne contaminada com o SIV (25). O HIV-1 foi originado do SIV de chimpanzés enquanto o HIV-2 tem o genoma similar ao do SIV de um macaco do velho mundo, o *Cercocebus atys* (*sooty mangabey*) (26).

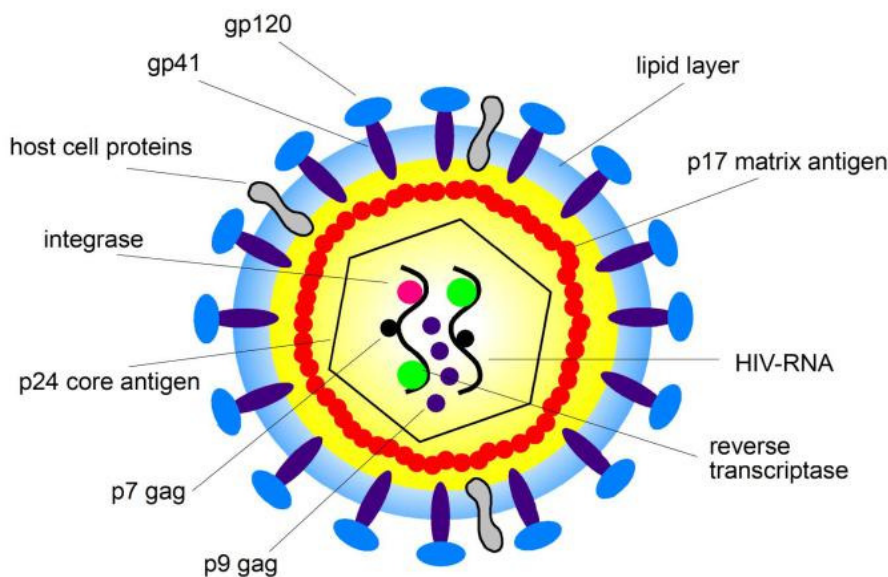
A partícula viral do HIV possui uma estrutura esférica de aproximadamente 100 nanômetros (Figura 1). A camada externa do vírus, chamada de envelope, possui uma membrana lipoprotéica. No envelope, integrados à membrana, estão as proteínas do hospedeiro e também as proteínas de um complexo de proteínas virais denominado Env. As proteínas do hospedeiro, incorporadas à membrana durante o brotamento, podem ser HLA classe I ou II ou proteínas de adesão para facilitar a adesão a outras células. No complexo Env, estão cerca de 70 glicoproteínas virais, cada uma composta de trímeros de uma proteína externa chamada gp120 e uma proteína transmembrana, a gp41. A proteína p17 está ancorada à parte interna da membrana lipoprotéica viral e o antígeno p24 contém duas cópias do RNA do HIV-1. Este RNA é parte de um complexo que é composto de uma nucleoproteína p7 e da transcriptase reversa (RT) p66. A partícula viral contém todo o aparato necessário para a replicação: a RT, uma integrase p32 e uma protease p11 (11).

O vírus HIV têm três quadros de leitura aberta principais - *gag* (*group antigen*), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) – e outros genes adicionais que codificam as proteínas acessórias e regulatórias (Figura 2) (11, 25).

A replicação dos retrovírus geralmente depende dos três genes principais: *gag*, *pol* e *env*. A estrutura clássica do vírus é 5'LTR-gag-pol-env-LTR3', sendo as regiões LTR (long terminal repeats) não codificadoras. No HIV-1 o gene *gag* codifica as proteínas estruturais p17, p24 e p15, o gene *pol* codifica a protease p11, a transcriptase reversa p66 e a integrase p32 e o gene *env* codifica as duas proteínas do envelope: gp120 e gp41 (11). As proteínas *gag* e *env* são componentes estruturais que compõe o nucleocapsídeo e a membrana externa do envelope, enquanto as proteínas *pol* desempenham funções enzimáticas essenciais e estão encapsuladas dentro da partícula viral (27).

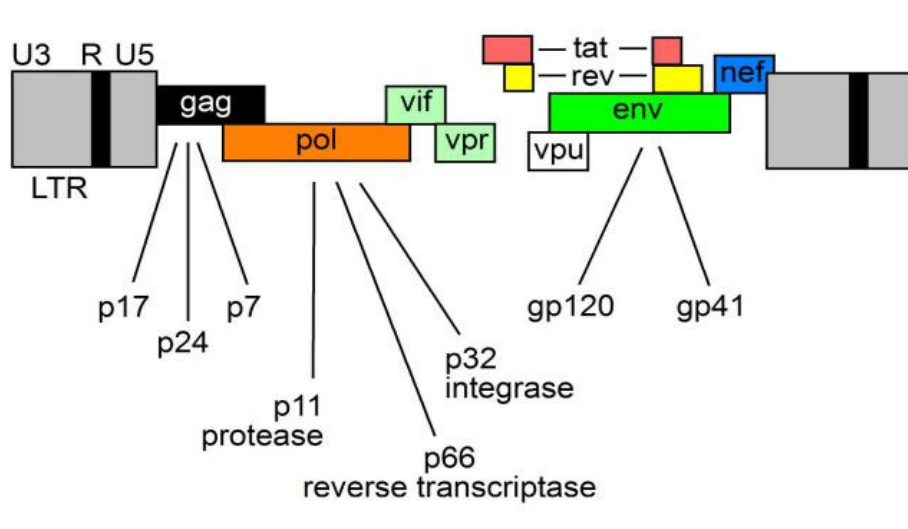
Outras proteínas codificadas pelo HIV-1 são as proteínas acessórias *vpr*, *vpu* e *vif* e as proteínas regulatórias *tat*, *rev*, *nef*. Estas proteínas embora não sejam indispensáveis para a replicação, desempenham funções diretamente associadas à replicação viral (11, 27). Algumas delas são encontradas na partícula viral (*vif*, *vpr*, e *nef*), outras possuem papel regulatório (*tat* e *rev*) e *vpu* está envolvida na montagem do vírus (27).

Figura 1. Estrutura de uma partícula viral.



(Fonte: Adaptado de Hoffmann, C. and J. K. Rockstroh (2012) (11))

Figura 2. Estrutura genética do vírus HIV.



(Fonte: Adaptado de Hoffmann & Rockstroh (2012) (11))

Vpr é importante para a replicação em macrófagos, pode estimular a LTR e outros promotores e ainda é importante para o complexo pré-integração ao núcleo. *Vpu* é importante para o brotamento e estimula a liberação do vírion assim como para a degradação do CD4; mutações em *vpu* resultam em persistência do vírus na célula hospedeira (27). *Vif* está associado à replicação em células T CD4+, células T não-permissivas e macrófagos, células deficientes em *vif* entram na célula alvo, iniciam a replicação, mas a síntese do DNA proviral não se completa (11).

Tat está envolvido na transcrição, é um potente trans-ativador do promotor LTR e aumenta a processividade das polimerases promovendo o alongamento do RNA (27). *Rev* é importante na exportação do RNA para o citoplasma. *Nef* está envolvido com a ativação as células T e indução da regulação negativa de moléculas CD4 e do HLA classe I da superfície das células infectadas, o que pode representar um mecanismo de escape do vírus ao ataque pelas células T citotóxicas CD8+ e evitar o reconhecimento pelas células T CD4+, sabe-se que deleções em *nef* tornam a replicação mais lenta (11).

As cepas do HIV-1 estão agrupadas em 3 grupos M, N e O. O grupo M possui 9 subtipos reconhecidos: A–D, F–H, J e K, que são geneticamente equidistantes, divergindo de 20-30% no gene *env* e 15-22% no gene *gag* (28). Os subgrupos E, I e G são considerados recombinantes (29). Os três grupos principais são M, N e O, sendo M o mais comum. Os subtipos diferem não somente nos genes *env*, *gag* e *pol*, mas também nas LTRs, nos

promotores, na resposta a fatores transcricionais e na seqüência de genes acessórios e regulatórios. Estas diferenças podem interferir com o tropismo, a cinética de replicação e a transmissão do vírus assim como na progressão da doença (28).

O retrovírus possui duas cópias de RNA fita simples por vírion, o que leva à necessidade de baixa afinidade da RT para permitir a troca de molde. Esta baixa afinidade leva a uma taxa de recombinação elevada entre as duas fitas que gera uma grande diversidade de vírus. A transcriptase reversa do HIV tem uma taxa de erro bastante alta quando comparada com as DNA polimerases, o que leva a uma frequência aumentada de mutação. Estas altas taxas de recombinação e mutação são responsáveis pela capacidade do vírus de escapar das defesas do hospedeiro assim como desenvolver resistência aos fármacos (25, 30) .

2.2 Ciclo de replicação do vírus HIV

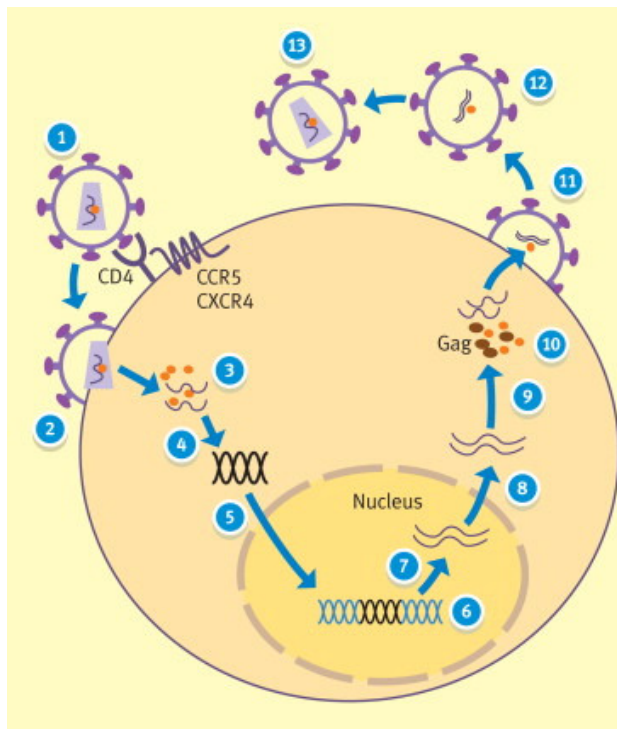
Já nos primeiros relatos da epidemia de AIDS, e muito antes do isolamento do vírus HIV, já se sabia que a imunodeficiência estava associada a uma disfunção que o agente etiológico induzia nas células T CD4+ (13). Após a descoberta do HIV como agente etiológico da AIDS, o entendimento do seu ciclo de vida foi crucial para o reconhecimento de alvos para drogas antiretrovirais. A Figura 3 mostra a ordem das etapas do ciclo de replicação do vírus HIV, desde a ligação ao receptor CD4 até a maturação.

A glicoproteína CD4 é um receptor primário, específico e indispensável para o HIV-1, HIV-2 e SIV (31). O ciclo celular do HIV começa com a ligação da gp120 aos receptores e o processo de entrada na célula se dá através da fusão direta do vírus com a membrana da célula, mediada pelas proteínas do envelope que têm alta afinidade por CD4. A gp120 se fixa na membrana celular através da ligação ao receptor CD4. Co-receptores adicionais são necessários para a entrada eficiente do vírus na célula hospedeira, os receptores de quimiocinas CCR5 (32) e CXCR4 (33) são utilizados pelo vírus juntamente com o receptor primário CD4 (34).

As proteínas do envelope gp120 e gp41 mediam a ligação do vírus à célula e a interação com CCR5 ou CXCR4 desencadeia as mudanças conformacionais em *env*, resultando na fusão das membranas viral e celular (35). A ligação de gp120 à CD4 não

somente é um passo crucial para a entrada do vírus, mas também interfere com as vias intracelulares de sinal de transdução e promove apoptose em células T CD4+. Dois tipos de tropismo foram identificados primariamente de acordo com o tipo de célula e de acordo com o co-receptor utilizado junto com o CD4 para a entrada do vírus na célula. Quanto ao tipo celular, o primeiro tipo de vírus que é capaz de se propagar em culturas de macrófagos, mas incapaz de infectar células T, são chamados de *M-tropic*, e o segundo tipo que se propaga bem em células T, mas não em macrófagos, de *T-tropic* (11). Os vírus que tem tropismo por macrófagos (*M-tropic*) utilizam o CCR5 como co-receptor, enquanto os vírus que infectam células T (*T-tropic*) usam CXCR4 (35).

Figura 3. Etapas do ciclo de replicação do vírus HIV .



Legenda:

- 1 Ligação ao receptor e co-receptor
- 2 Fusão
- 3 Liberação do capsídeo
- 4 Transcrição reversa
- 5 Importação pelo núcleo.
- 6 Integração
- 7 Transcrição
- 8 Exportação do núcleo
- 9 Tradução
- 10 Montagem
- 11 Brotamento
- 12 Liberação
13. Maturação

(Fonte: Adaptado de Lampejo & Pillay, 2013 (24))

Em pacientes com progressão rápida da doença, isola-se predominantemente vírus que utilizam o co-receptor CXCR4 quando comparado ao CCR5 que é predominantemente encontrado nos estágios mais precoces da doença. CXCR4 é expresso sobretudo em células T *naive*, enquanto o CCR5 é usualmente encontrado em células ativas ou células de memória (11). Vírus que usam CCR5 compreendem quase todos os vírus transmitidos sexualmente assim como a maioria dos vírus na infecção primária, embora a contaminação direta com vírus que usa CXCR4 possa ocorrer através de sangue contaminado (25). Pode ocorrer troca

de co-receptor, um processo adaptativo que torna um vírus que usava CCR5 capaz de usar ambos co-receptores ou somente CXCR4. Esta troca está associada com a habilidade do vírus entrar em novas populações de células mais eficientemente e com uma renovação e morte celular dos linfócitos mais rápida (25). Embora a troca de co-receptor seja comum, não é essencial para a progressão da doença (36).

A importância do CCR5 como o co-receptor em células de vírus M-tropic se deve ao fato de que indivíduos com CCR5 defeituoso sejam resistentes à infecção por HIV por transmissão sexual (37). Uma deleção de 32 pares de bases no CCR5 leva a uma alteração no módulo de leitura, e conseqüentemente a uma proteína severamente truncada, que não é detectada na superfície da célula ou no citoplasma. Indivíduos com esta deleção demonstram uma expressão reduzida do CCR5 e são resistentes à infecção por vírus que utilizam CCR5 como co-receptor, mas permanecem susceptíveis à infecção por vírus que usam CXCR4 (29). Indivíduos heterozigotos para esta deleção, infectados com HIV, apresentam uma progressão mais lenta da doença, uma melhor resposta ao tratamento e uma incidência de linfoma reduzida (11).

Em 2009, Hütter *et al.* relatou um caso em que houve o transplante de células tronco de um indivíduo homozigoto para a deleção no CCR5 para um paciente com leucemia mielóide aguda e infecção por HIV. O resultado foi um quimerismo completo no paciente e o sangue periférico demonstrou uma mudança de um genótipo heterozigoto para homozigoto para o alelo delta-32. A terapia antiretroviral foi suspensa e o vírus HIV-1 não foi detectado no sangue periférico, medula óssea ou na mucosa retal do paciente quando o RNA ou DNA proviral foi testado por PCR (38). Este relato não somente reafirmou a importância do CCR5 na manutenção da infecção e da progressão da doença, mas também encorajou a continuidade no desenvolvimento de terapias que usem CCR5 como alvo.

Vários produtos que usam CCR5 como alvo terapêutico já foram desenvolvidos e um deles, o Maraviroc, já foi aprovado pelo FDA desde 2007 para o tratamento da infecção por HIV-1 (39). Estudos têm demonstrado que o Maraviroc melhora a resposta imunológica e revelam que a farmacocinética e a segurança desta droga são favoráveis em pacientes com risco cardiovascular ou naqueles com co-infecções como tuberculose ou hepatite. Estudos de longa duração se fazem necessários para avaliar o benefício real desta droga para paciente em que o tratamento mais tradicional não foi favorável ou não é aplicável (40).

Embora CCR5 e CXCR4 sejam os co-receptores mais relevantes *in vivo*, foram identificados muitos outros co-receptores além de CXCR-4 e CCR5, tais como CCR3, CCR2, CCR8, CCR9, STRL33, Gpr 15, Gpr-1, APJ e ChemR23 utilizando-se células transfectadas (11).

Após a entrada do vírus na célula, o genoma viral é então transcrito em DNA no citoplasma da célula hospedeira. A conversão do RNA viral em DNA proviral é feita pela transcriptase reversa viral e é um passo muito importante para a replicação do vírus (41). A transcriptase reversa viral é uma holoenzima que é capaz de catalizar a polimerização DNA e RNA dependentes assim como promover a hidrólise do RNA (atividade de RNase H) (42).

O início da transcrição reversa se dá através de uma molécula de tRNA que se liga ao sítio de ligação do *primer* (PBS). A síntese prossegue de 5' para 3' formando um híbrido DNA-RNA. A porção RNA do híbrido é então degradada pela RNase H gerando um fragmento de DNA conhecido como *minus strand strong stop* (3'-5'). Utilizando pequenas regiões de homologia, a *minus strand* “pula” da extremidade 5' para a 3' do genoma (41). A síntese da *plus-strand* (5'-3') ocorre utilizando-se os fragmentos de RNA remanescentes da *minus strand*. O tRNA ligado ao sítio PBS é removido pela RNase H, permitindo que a síntese da segunda fita aconteça (30). Após estes eventos, a polimerização está completa e a transcrição reversa resulta em um DNA dupla fita com regiões LTR nas duas extremidades (11).

A integrase viral juntamente com as enzimas de reparo do hospedeiro, insere o genoma viral nos domínios transcricionalmente ativos do DNA do hospedeiro. A integração se dá em duas etapas: o processamento 3' e a transferência de fitas. No processamento 3' a integrase cliva as extremidades 3' do DNA viral, removendo um dinucleotídeo em cada extremidade, produzindo novas extremidades 3' hidroxil. Na transferência de fitas, a integrase promove a ligação irreversível entre os DNAs viral e do hospedeiro (11).

Uma vez integrado no genoma do hospedeiro, é chamado de próvirus (25). A produção de partículas virais utiliza o aparato de transcrição do hospedeiro e do vírus e as proteínas virais são transportadas e montadas próximo à membrana celular. O passo final é a saída do vírus da célula que utiliza um mecanismo de fusão da membrana que libera o vírion (partícula viral capaz de infectar novas células) da célula hospedeira. A clivagem de gag-pol pela protease viral produz vírions maduros (43).

2.3 História natural da Infecção por HIV e progressão da doença

A história natural da infecção por HIV é definida pela história da progressão da doença na ausência de tratamento. Na ausência da terapia antiretroviral, a maioria dos indivíduos desenvolve uma perda progressiva de células T CD4+ e imunodeficiência que leva à aquisição de infecções oportunistas. Com a globalização do acesso ao tratamento, houve uma redução dramática do número de pessoas que progridem naturalmente (44). No entanto, o conhecimento da história natural da infecção ainda é muito importante para a tomada de decisão sobre quando iniciar a terapia antiretroviral e para o diagnóstico preciso de indivíduos com os primeiros sintomas da infecção e que não haviam demonstrado sinais da doença (11). Embora o curso clínico, imunológico e virológico da infecção não-tratada sejam variáveis, poucos indivíduos permanecem livres da progressão da doença por mais de 8-10 anos. Esta variabilidade se deve às características virais, resposta imune do hospedeiro e fatores ambientais (45).

Espera-se que, todos os indivíduos infectados pelo HIV que não recebam tratamento progridam para a AIDS. No entanto de 1 a 5%, dos indivíduos HIV positivos permanecem naturalmente assintomáticos e com contagens de CD4+ estáveis por um tempo mais longo, embora apresentem viremia detectável (45). Outro grupo de indivíduos infectados, representando menos de 1%, é capaz não somente de permanecer assintomático a longo termo, mas também de manter os níveis de viremia indetectáveis sem o uso de terapia antiretroviral (46). O primeiro grupo é chamado de não progressores a longo termo e o segundo de controladores de elite.

2.4 Transmissão

O vírus HIV está presente nos fluidos corporais como sangue, sêmen, leite materno e outros e pode ser transmitido por diversas vias. As rotas de transmissão mais comuns são: parenteral, vertical, uso de drogas ilícitas, sexual e ocupacional (47). O modo de transmissão sexual do HIV é o mais comum (44). Intervenções como a realização do teste de HIV de rotina nos bancos de sangue e nos locais de transplante de órgãos reduziram a transmissão parenteral. A transmissão vertical também ficou mais rara entre as gestantes que têm acesso ao sistema de saúde e recebem tratamento e os bebês que são acompanhados após o parto.

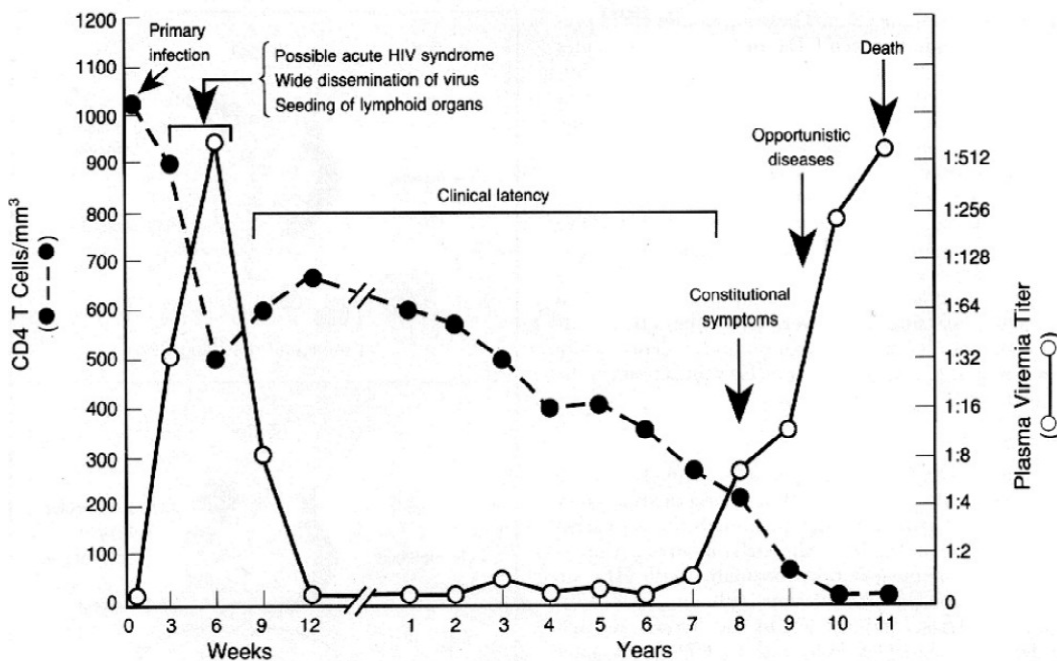
Outras formas de transmissão são muito mais raras, mas já foram descritas (11). Uma delas é através de administração de comida pré-mastigada pela mãe a crianças (48) e através de feridas abertas que entraram em contato com sangue contaminado com HIV e indivíduos que foram mordidos por indivíduos infectados (49).

A eficiência da transmissão depende de fatores como as propriedades biológicas do vírus, sua concentração nos fluidos corporais, carga viral do transmissor, rota de infecção, susceptibilidade clínica do hospedeiro (como presença de úlceras genitais pré-existentes), susceptibilidade do hospedeiro a nível celular e imunológico (29).

2.5 Fases da Infecção por HIV

O curso típico da infecção por HIV está ilustrado na Figura 4. Num primeiro momento, após a infecção primária, observa-se um aumento significativo na viremia e um declínio severo na contagem de células T CD4+. Ocorre então uma reação do sistema imunológico que gera uma diminuição da viremia e inicia-se um período de latência clínica. O período sintomático é acompanhado de uma queda nas contagens de CD4 até atingir um nível crítico que deixa o indivíduo susceptível à infecções oportunistas (50).

Figura 4. Curso da infecção pelo vírus HIV na ausência de terapia antiretroviral.



(Fonte: Adaptado de Pantaleo *et al*, 1993 (50))

2.5.1 Infecção primária

A infecção primária ou aguda é caracterizada por um pico na viremia associada com um declínio temporário nas células T CD4+.

Após a transmissão, o vírus se dissemina rapidamente levando a uma explosão da viremia que se manifesta como a síndrome aguda do HIV (44). A princípio, as células T infectadas pelo HIV permanecem nos linfonodos até que a replicação atinja o limiar, dentro de 2 a 6 semanas. O pico de viremia está invariavelmente associado à redução no número de células T CD4+ (51).

Cerca de 70-80% dos indivíduos infectados apresentam sintomas na soroconversão como consequência da carga elevada de vírus circulante e da resposta imune aguda. Os sintomas mais comuns são febre, linfadenopatia, artralgia, mialgia, mal-estar, rash maculopapular, úlceras orais e faringite. A maioria dos sintomas se resolve em 7-10 dias. Alguns indivíduos apresentam um quadro mais severo que pode levar a infecções oportunistas e depleção das células T CD4+ para menos que 200 células/ μL . Aqueles que apresentam um quadro mais severo na infecção primária parecem estar mais sujeitos a uma progressão mais rápida da doença (47). O pico de viremia é reduzido em cerca de 2 a 4 semanas e, embora seja suprimido após a soroconversão, o vírus não é extinto (51).

Existem evidências de que a redução nas células T CD4+ é consequência da replicação exacerbada do vírus e leva a uma resposta imunológica pelas células T citotóxicas CD8+ capaz de reduzir a replicação do vírus, redução esta que é mantida pela imunidade celular. A primeira resposta do sistema imune ao HIV é importante para prever a progressão da doença, os títulos do antígeno p24 na soroconversão pode ser um indicativo de como a doença deve progredir (51).

A depleção das células T CD4+ juntamente com a resposta imune específica para HIV leva a uma estabilização da viremia (*set point* viral), que depende do sistema imune do hospedeiro e da natureza do vírus (44). A viremia estabiliza após semanas ou meses de infecção, o nível da estabilização varia entre indivíduos e é um preditor de progressão da doença. Quanto mais alto é o *set point*, mais rápido é o declínio das células T CD4+ (51).

2.5.2 Infecção assintomática

Após a fase aguda, a viremia é reduzida lentamente e de forma linear e os níveis de CD4+ se elevam (51). A fase assintomática é caracterizada por um nível de CD4+ mais elevado porém abaixo do normal (350-800 células/ μ L) (52) e estabilização da carga viral, que pode variar de indetectável até 1 milhão de cópias/mL (51).

A fase assintomática é assim chamada porque a maioria dos indivíduos é completamente assintomática, porém alguns podem apresentar linfadenopatia generalizada persistente (52).

O período entre a infecção primária e o desenvolvimento dos sintomas ou estágios mais avançados da doença varia. Na maioria dos casos, a contagem de CD4+ diminui lentamente por cerca de 5 a 6 anos, mas em alguns indivíduos as contagens podem permanecer estáveis por muito mais tempo (47). Os pacientes podem ser categorizados de acordo com a velocidade do declínio nas células T CD4+. Aqueles com perda de mais de 100 células/ μ L dentro de 6 meses têm risco alto de progressão para AIDS. O risco moderado se define por perda de 20-50 células/ μ L em por ano. O risco baixo corresponde a menos que 20 células/ μ L em um ano (11).

2.5.3 Infecção sintomática

O aparecimento de infecções oportunistas e câncer definem a última fase da progressão natural da doença.

O risco da infecção progredir para AIDS aumenta quando a contagem de CD4+ atinge um valor menor que 350 células/ μ L. Indivíduos com contagem de CD4+ entre 200-350 células/ μ L, estão sob o risco de desenvolver tuberculose, candidíase oral e vaginal, varicela-zoster, assim como pneumonia pneumocócica (52).

Contagens de CD4+ abaixo de 200 células/ μ L colocam os pacientes sob risco de desenvolverem pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente chamado de *Pneumocystis carinii*) e muitas outras infecções oportunistas. Entre as infecções oportunistas estão toxoplasmose cerebral, candidíase esofágica, diarreia e doenças de pele (52).

Quando a contagem chega abaixo de 100 células/ μ L, micobactérias, fungos como *Cryptococcus neoformans*, citomegalovírus e câncer são os problemas mais comuns (52).

2.6 Patogênese do HIV

Para melhorar as estratégias terapêuticas, e desenvolver vacinas eficazes contra o HIV é preciso entender sua imunopatogênese. Uma série de fatores virais e do hospedeiro influenciam diretamente os mecanismos de patogênese do vírus HIV. Ainda que a fonte seja a mesma, o curso da infecção pode ser totalmente diferente de um indivíduo para outro (11). Um bom exemplo seria a evolução da doença em progressores e não progressores a longo termo, o segundo grupo possui características genéticas que interferem diretamente na capacidade patogênica do vírus.

O vírus HIV utiliza os recursos das células do hospedeiro para promover sua própria replicação e transmissão, além de ter desenvolvido um repertório de mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro. Durante o curso da infecção o vírus escapa da resposta imune humoral e mediada por células de diversas formas. A primeira resposta imune do hospedeiro após a infecção aguda, que envolve resposta humoral e celular, é capaz de reduzir a carga viral, mas incapaz de eliminar o HIV. Diversos fatores contribuem para a permanência do vírus tais como a falta de alvos amplamente neutralizadores, a regulação negativa do HLA do hospedeiro, a capacidade de ficar latente e o surgimento de cepas com mutações em sítios cruciais para as interações com o hospedeiro (53).

Apesar de todos os mecanismos de evasão, na maioria das vezes o vírus acaba causando um descontrole do sistema imunológico do hospedeiro que favorece a progressão da doença. A replicação do vírus leva à uma ativação crônica do sistema imune do hospedeiro e está diretamente associada à progressão para AIDS (11, 53-54). Esta ativação imunológica induzida pelo HIV resulta em uma maior produção e destruição de células, um aumento de morte celular nas células T, um declínio na população de células T CD4⁺ e, conseqüentemente, imunodeficiência (54).

Durante a infecção aguda, o vírus HIV destrói uma quantidade grande de linfócitos T CD4⁺ CCR5⁺ na mucosa intestinal através de mecanismos citopáticos e de apoptose, um dano desta magnitude poderia indiretamente causar esta ativação crônica do sistema imune do hospedeiro. Outras causas da ativação crônica foram revisadas por Cadogan & Dalglish (2008), são elas enfraquecimento da defesas da mucosa intestinal após a infecção aguda, depleção de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺, influência do interferon α produzidos por

células dendríticas ativadas, estímulo viral por produtos dos genes do vírus, mimetismo molecular com HLA e outras proteínas próprias do hospedeiro (53).

2.7 Diagnóstico da Infecção por HIV

O diagnóstico precoce da infecção por HIV é decisivo para evitar a transmissão da doença bem como para assegurar o monitoramento e tratamento adequado dos indivíduos infectados. Mesmo nos países mais ricos, cerca de 1/3 dos indivíduos infectados não sabem que têm o vírus e muitos já desenvolveram a imunodeficiência e apresentam infecções relacionadas (11, 55). O diagnóstico precoce e início do acompanhamento e terapia antiretroviral reduz a morbidade e a mortalidade, retardando a progressão da doença que leva à imunossupressão grave (55). O desenvolvimento de testes diagnósticos foi importante não somente para o diagnóstico de indivíduos infectados com HIV, mas também foi crucial para a segurança na doação de sangue e órgãos (11).

Existem diversas maneiras de detectar o vírus HIV. Os testes diagnósticos se dividem entre aqueles que detectam: somente anticorpos específicos, anticorpos específicos e antígenos, somente antígenos e, por último, o RNA do vírus (56).

Os anticorpos anti-HIV não podem ser detectados durante a janela imunológica, período durante o qual os testes moleculares são mais adequados. O RNA viral pode ser detectado 9-11 dias após a infecção, seguido do antígeno p24 que pode ser detectado 5 dias antes da soroconversão e os anticorpos específicos podem ser detectados por volta das 4 semanas após a transmissão (11, 56).

A realização do teste de HIV imediatamente após a possível transmissão não é recomendável devido à janela imunológica, exceto quando há necessidade de documentação como no caso de acidente com perfuro-cortantes. Após 3 semanas da possível transmissão o teste pode então ser realizado. A infecção não pode ser descartada até 3 meses após a possível transmissão, se não houver uma nova exposição durante este período (11).

O diagnóstico da infecção por HIV é primariamente baseado em um teste de *screening*, que é feito por imunoensaio (*EIA, enzyme immunoassay*). Quando o resultado do *screening* é positivo, os testes confirmatórios utilizando-se a mesma amostra se fazem necessários. Os testes confirmatórios são feitos por *Western blot* ou imunofluorescência indireta, devido à sua alta especificidade (57). Em situações especiais, o *screening* pode ser

feito através de um teste rápido, baseado geralmente em imunocromatografia e mais raramente em aglutinação ou imunofiltração (11).

A primeira geração de EIAs para diagnosticar a infecção por HIV foi aprovada pelo FDA ainda na década de 80. Estas técnicas utilizavam antígenos virais lisados para capturar anticorpos anti-HIV e detectar anticorpos IgG específicos contra o HIV. Eram capazes de detectar o HIV após 6-8 semanas de infecção, porém com sensibilidade e especificidade baixas. A especificidade foi aumentada na segunda geração de testes através do uso de proteínas e polipeptídeos recombinantes na produção de antígenos virais e adiantou a detecção em cerca de uma semana (57).

A terceira geração, capaz de detectar anticorpos IgM e IgG, detecta HIV-1 como as anteriores e tem sensibilidade aumentada para HIV-2 e HIV-1 inclusive grupo O. O diagnóstico já pode ser feito na terceira semana de infecção (57).

A quarta geração, aprovada em 2010 pelo FDA, detecta antígenos e anticorpos (IgG, IgM e o antígeno p24) e também é o primeiro teste indicado para crianças a partir dos dois anos e mulheres grávidas. A quarta geração é altamente sensível e já detecta o vírus com 2 semanas de infecção (55, 57).

Quanto aos testes confirmatórios, o *Western blot* é a técnica mais utilizada. O lisado do vírus é separado por eletroforese, transferido para uma membrana e incubado para identificar complexos antígeno-anticorpo específicos. Os anticorpos se ligam às proteínas do HIV fixadas que, quando expostas ao substrato, mostram um padrão que pode ser lido como positivo, negativo ou indeterminado. A especificidade da técnica é alta devido à separação e concentração do antígeno. Esta técnica é menos sensível que as técnicas de EIA de terceira e quarta geração e é considerada complexa (57).

A imunofluorescência indireta é menos utilizada e identifica a presença de anticorpos quando mistura plasma ou soro com células que expressam HIV. Esta técnica é feita em uma lâmina que contém células infectadas com HIV, a amostra do paciente é adicionada e incubada com as células. Após a incubação, os anticorpos ligados podem ser identificados utilizando-se um anticorpo anti-humano conjugado com uma molécula fluorescente. Esta técnica detecta somente HIV-1 (57).

Segundo o CDC, este esquema de testagem atual não detecta a infecção aguda e classifica erroneamente 60% das infecções por HIV-2 como HIV-1 baseada em resultados de *Western blot* (58). Tendo em vista a relevância da detecção da infecção aguda para a limitação da transmissão da doença e a possibilidade de resultados falso-negativos a partir dos testes confirmatórios no início da infecção por HIV, um esquema alternativo se faz necessário. Este problema poderia ser resolvido com o uso de um teste molecular. Os testes moleculares são capazes de detectar a infecção antes da soroconversão e podem ser úteis quando o *Western blot* é indeterminado (58).

As técnicas moleculares quantitativas para a detecção do HIV estão disponíveis, porém não estão aprovadas para o diagnóstico do HIV, salvo em situações como suspeita de infecção aguda ou transmissão vertical em que podem auxiliar no diagnóstico já que a detecção de anticorpos pode estar comprometida. Estas técnicas não devem ser utilizadas para exclusão da infecção. Elas são, porém, cruciais no monitoramento dos pacientes infectados (11). Em 2006, a Gen Probe Aptima, uma técnica qualitativa baseada em amplificação de ácidos nucleicos foi aprovada para o diagnóstico do HIV e para confirmação de um EIA positivo (59) e, embora seja uma técnica muito sensível na infecção aguda, pode ter uma porcentagem de falso-negativos de 4% durante a fase crônica da infecção (57).

Os testes rápidos de HIV foram aprovados pelo FDA pela primeira vez em 2002; podem ser aplicados de forma rápida e fácil sem a necessidade de equipamentos caros e podem ser feitos no local de atendimento do paciente com tempo de resultado de 15-30 minutos. Estes testes podem ser feitos em plasma, soro, sangue total ou capilar, mas apresentam uma sensibilidade diminuída quando são utilizados outros materiais que não soro ou plasma. Os testes rápidos detectam somente anticorpos, correspondendo aos EIA de terceira geração e a maioria detecta HIV-1 e HIV-2. (11, 57).

Os testes rápidos para HIV oferecem diversas vantagens em cenários em que o resultado do teste pode ter conseqüências imediatas, tais como no parto de gestantes que não tenham sido testadas recentemente, cirurgias e acidentes com pérfuro-cortantes. Os testes rápidos também são utilizados em países com pouca infra-estrutura na assistência médica. Estes devem servir somente como orientação inicial e devem ser repetidos por testes tradicionais na primeira oportunidade (11, 55). Novos testes rápidos experimentais capazes de detectar o antígeno p24 já foram desenvolvidos e estão sendo testados. No entanto, há evidências de que estes não detectam p24 no mesmo nível que os EIA de quarta geração (57).

Um teste de *screening* negativo exclui infecção por HIV, a menos que o paciente esteja na janela imunológica. Após a exposição, o teste de *screening* deve ser repetido em 3 meses mesmo que o primeiro teste seja negativo. Após um teste de *screening* positivo ou indeterminado, um teste confirmatório deve ser realizado na mesma amostra e uma nova amostra deve ser coletada para a repetição dos testes (55).

O diagnóstico da infecção por HIV em bebês não pode ser feito pelos métodos tradicionais em função da presença dos anticorpos maternos adquiridos passivamente durante a gestação, que permanecem presentes no sangue do bebê até por volta de 12-18 meses. Neste caso, deve-se utilizar as técnicas de detecção da carga viral do HIV. Os bebês devem ser testados 48 horas após o parto e com 6 e 12 semanas de idade. Testes com resultados positivos devem ser repetidos com uma nova amostra. A exclusão completa da infecção deve ser documentada com, no mínimo, dois testes moleculares negativos e um teste sorológico negativo realizado de 18-24 meses de idade. Se houver algum risco adicional como a possível transmissão através da amamentação, o bebê deve ser testado mais frequentemente (11, 60).

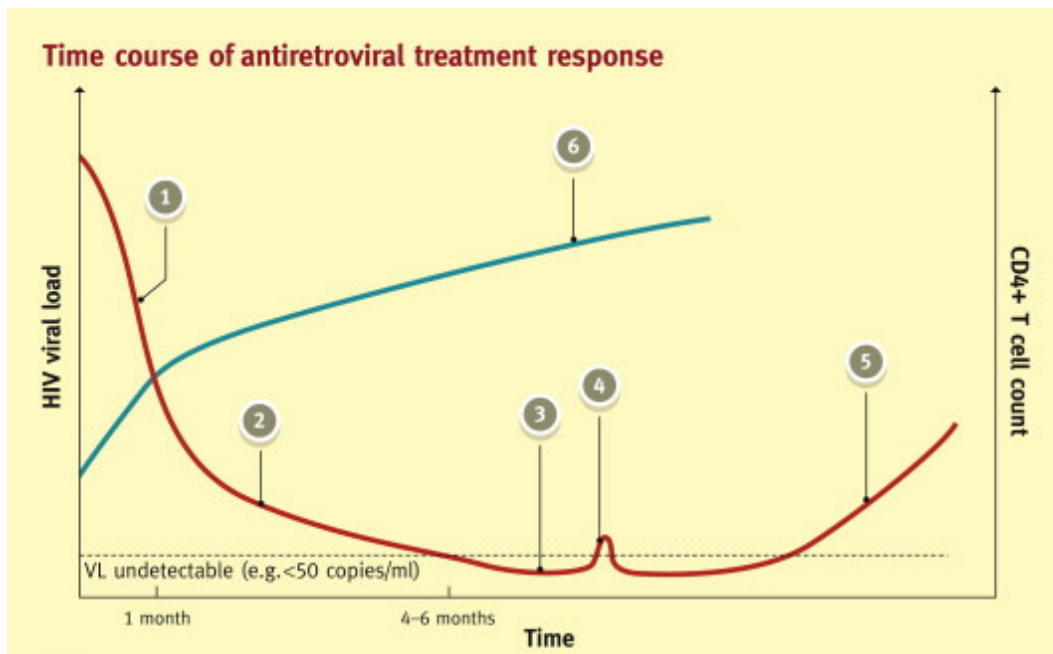
2.8 Terapia Antiretroviral para HIV

O desenvolvimento de antiretrovirais evoluiu rapidamente, transformando a infecção por HIV de uma doença fatal para uma doença crônica manejável. O objetivo primário da terapia antiretroviral é prevenir a progressão para AIDS, inibindo a replicação do vírus HIV de modo a manter a viremia baixa e permitir a reconstituição do sistema imunológico. Os objetivos secundários incluem a prevenção da transmissão já que a supressão da viremia reduz a infectividade e, por fim, prevenir a infecção em indivíduos expostos sexual ou ocupacionalmente (61). A combinação de antiretrovirais, chamada de HAART, é capaz de parar a replicação viral, resultando na reconstituição do sistema imunológico (62).

O curso do tratamento antiretroviral está descrito na Figura 5. Pode ser observado um declínio da carga viral em dois estágios: declínio da carga viral através da inibição da replicação do HIV em células infectadas ativas (5.1) e, posteriormente em macrófagos (5.2). Um nível baixo de viremia persiste devido à replicação em níveis baixos ou liberação de vírus dos reservatórios (5.3) (61). Episódios transitórios de carga viral detectável, os chamados *blips* (5.4), podem aparecer devido à uma variância na sensibilidade da técnica ou uma explosão de replicação viral, ainda que em níveis baixos, devido à ativação das células (61, 63). Estes picos transitórios geralmente não passam de 400 cópias/mL (61).

Um salto na carga viral (rebote viral) (5.5) pode representar falha virológica, que pode estar associada à problemas de aderência do paciente à terapia e consequente desenvolvimento de baixa susceptibilidade ao tratamento atual (61). A falha virológica geralmente se define como uma carga viral detectável acima de 1000 cópias/ mL, ou seja, 2 cargas virais consecutivas dentro de um intervalo de 3 meses, após 6 meses no mínimo de terapia antiretroviral (64). O aumento da contagem de CD4 (5.6) é indicativo de reconstituição do sistema imunológico e diminuição da ativação imunológica (61).

Figura 5. Representação do curso de tratamento com antiretrovirais com relação à variações na viremia e contagem de células CD4+.



Legenda: (1) Primeiro estágio de declínio da carga viral; (2) Segundo estágio de declínio da carga viral; (3) Viremia residual; (4) *Blip* viral ; (5) Rebote viral; (6) Aumento na contagem de CD4.

(Fonte: Adaptado de Williams, I. G. (2013) (61))

2.9 Marcadores laboratoriais de progressão da doença

Os primeiros estudos a considerar a correlação entre marcadores imunológicos e progressão da doença demonstraram uma forte associação entre a contagem de células CD4 e o desfecho clínico (65-66). Também foi estudada a correlação entre carga viral e desfecho clínico e foi demonstrado que a carga viral está também fortemente relacionada com a progressão da doença independentemente da contagem de CD4 (66-69).

A contagem de células CD4 no início da infecção pode ser considerada o fator prognóstico predominante em pacientes iniciando a HAART (70), enquanto a carga viral provou ser um melhor fator preditivo de progressão da AIDS, tempo de sobrevivência e mortalidade do que a contagem de CD4 (68, 71). A utilização da carga viral acompanhada da contagem de CD4 como preditores da progressão da doença é mais eficaz do que o uso de somente um dos testes (72). A quantificação da carga viral medida no plasma ou soro de pacientes HIV positivos associada à contagem de linfócitos CD4 são poderosas ferramentas no monitoramento de pacientes HIV positivos (73).

A detecção do RNA do HIV e o aumento da contagem do vírus no plasma estão associados com a progressão da doença e o declínio na contagem de CD4 (67, 70, 74). A explicação para a correlação é simples: uma quantidade maior de vírus resulta em uma destruição mais rápida destes linfócitos. Quanto mais rápido os linfócitos forem destruídos, mais cedo será o desenvolvimento da imunodeficiência e conseqüentemente mais rápida será a progressão da AIDS e morte (75-76).

A carga viral e a contagem de CD4 não somente são importantes marcadores de progressão da doença, da eficácia do tratamento e de mortalidade, mas também para detectar falha virológica. A efetividade da HAART pode avaliada somente pela carga viral baixa constante e pelo aumento das células CD4, sem a necessidade do uso de outros marcadores (69, 77).

Na soroconversão, a quantidade de HIV no plasma ou soro são relativamente altos e se comparam aos estágios mais avançados da doença. Somente após a soroconversão os níveis de HIV no plasma ou soro se tornam estáveis (*set point*) e podem ser correlacionados com o desfecho (78). Aos 6 meses depois do início da HAART, a contagem de CD4 e a carga viral

se tornam fortemente associados com a progressão da doença (74). A carga viral aumenta com o desenvolvimento da resistência à terapia antiretroviral ou com a piora do quadro clínico (79). Espera-se que a manutenção de níveis indetectáveis de HIV no plasma, seja um indicativo de que a terapia antiretroviral esteja funcionando (80-82). O sucesso da HAART é definido pela supressão da viremia no plasma baseado em duas quantificações de carga viral consecutivas com resultado abaixo do limite de detecção (83). A detecção precoce e acurada da falha terapêutica é essencial para evitar a resistência à terapia antiretroviral, que pode resultar no progresso da AIDS levando à complicações da doença e, conseqüentemente, à morte.

2.10 Monitoramento dos pacientes infectados pelo HIV

O monitoramento da infecção pelo HIV tem como objetivo avaliar a progressão da doença em indivíduos virgens de tratamento e a resposta aos antiretrovirais. Esta avaliação geralmente é feita através da quantificação da carga viral do HIV e da contagem de células T CD4+ a cada 3 ou 4 meses. Após o início da terapia antiretroviral, um painel de testes hematológicos e bioquímicos deve ser adicionado para a avaliação da toxicidade (84). Testes adicionais como testes para resistência aos antiretrovirais, testes de tropismo para identificação do co-receptor, teste de HLAB* e testes que medem os níveis dos antiretrovirais no plasma (TDM, Therapeutic Drug Monitoring) são utilizados quando necessários e disponíveis.

O acompanhamento adequado dos pacientes infectados não somente permite intervenções quando necessárias como o início do tratamento, mas também reduz a necessidade de intervenções mais caras como a troca de tratamento ou a realização de testes para resistência aos antiretrovirais (85).

A interpretação dos resultados dos testes de monitoramento deve ser feita por profissionais clínicos experientes e os testes devem ser feitos preferencialmente no mesmo laboratório durante o acompanhamento (11).

A contagem de células T CD4+ é um parâmetro importante para o monitoramento da infecção por HIV. Em locais com recursos reduzidos, somente o CD4 é utilizado no monitoramento de pacientes infectados com HIV.

O padrão-ouro para a contagem de CD4 é a citometria de fluxo. A citometria de fluxo convencional é considerada um método caro e trabalhoso para ser realizada em locais mais pobres, para isto métodos alternativos estão sendo criados, mas ainda não há consenso sobre a utilização destes métodos (85).

A contagem normal CD4 em adultos não infectados geralmente fica acima de 500 células/ μ L embora haja diferenças nos parâmetros considerados normais entre laboratórios. Nos indivíduos infectados, o risco de aquisição de infecções oportunistas e cânceres aumenta muito quando a contagem de CD4 está abaixo de 200 células/ μ L. Como já foi dito anteriormente, é consenso que inicie-se a terapia antiretroviral quando a contagem de CD4 está abaixo de 350 células/ μ L (86).

Após o início da terapia antiretroviral, com a devida aderência ao tratamento, os níveis de CD4 devem voltar ao normal, com um aumento mais acentuado nos primeiros meses e posteriormente mais lento. Existem evidências de que pacientes que mantêm a supressão viral (carga viral abaixo de 200 cópias/ μ L) com contagens de CD4 normais, raramente demonstram um declínio para 200 cópias/ μ L. Alguns especialistas sugerem que a contagem de CD4 pode ser feita a cada 6 meses nestes pacientes, (87-88) embora o consenso atual recomende a testagem a cada 3- 4 meses.

A quantificação do HIV no plasma de pacientes infectados é importante para a determinação do *set point* da carga viral, ponto de estabilização da viremia, que se estabelece durante a infecção crônica. O *set point* está associado com o declínio na contagem de CD4 e o risco de progressão para AIDS, quanto maior o *set point* pior o prognóstico. Em pacientes em tratamento, a carga viral é utilizada para monitorar a resposta ao tratamento e falha virológica (86). A carga viral também é importante como auxiliar no diagnóstico da infecção em bebês. Diversas técnicas estão disponíveis no mercado para a quantificação do HIV-1. Estas técnicas estão descritas e comparadas no artigo de revisão escrito como parte dissertação. Não existem ainda técnicas comerciais disponíveis para a quantificação do HIV-2, mas alguns laboratórios desenvolveram técnicas *in-house* (56).

O desenvolvimento da resistência aos antiretrovirais é decorrente da replicação viral na presença de concentrações de antiretrovirais insuficientes para suprimí-la completamente. A ocorrência de cepas resistentes leva à falha virológica. As mutações que conferem resistência ao vírus HIV para a drogas disponíveis já são conhecidas, o que permite sua

detecção por técnicas comerciais. Existem dois métodos de testagem de resistência: a genotipagem e a fenotipagem. Ambos utilizam o RNA do plasma e um pré-requisito para a detecção da resistência é que a carga viral da amostra testada seja no mínimo 500 ou 1000 cópias/ mL. No teste genotípico, as populações mutantes são detectadas por sequenciamento automático. No teste fenotípico, as regiões genômicas virais são transferidas para um vetor gerando um vírus recombinante que poderá crescer ou não na presença de uma determinada droga antiretroviral. O teste genotípico deve ser feito antes do início do tratamento para futura comparação quando e se necessário. O teste genotípico é mais barato e leva menos tempo para a liberação do resultado (24, 55-56).

O teste de tropismo identifica o co-receptor utilizado pelo vírus na amostra, o que pode ser um indicativo de progressão da doença. Existe somente uma técnica fenotípica comercial disponível com custo bastante alto (86).

Os níveis plasmáticos dos antiretrovirais são avaliados por uma técnica chamada TDM (*Therapeutic Drug Monitoring*). O conhecimento dos níveis plasmáticos pode ser útil em situações especiais como uso de combinações complexas de drogas, pacientes com peso corporal extremo, falha terapêutica, potenciais problemas de absorção e aderência, problemas no fígado e rins e uso de novas drogas com interações desconhecidas (11).

3 Justificativa

A quantificação da carga viral é um importante marcador de progressão da doença e sucesso do tratamento de pacientes HIV positivos. Os resultados de carga viral são importantes para avaliar o risco de progressão da doença, auxiliar a identificar o momento certo para iniciar a terapia, detectar falta de aderência ao tratamento, determinar falha virológica e necessidade de mudança no esquema de tratamento, identificar *blips* e rebote viral assim como auxiliar no diagnóstico de crianças até 2 anos.

Diversas técnicas comerciais estão disponíveis para a quantificação da carga viral do HIV-1: a maioria destas se baseia na detecção de ácidos nucleicos e outras na detecção de enzimas e antígenos. Três metodologias principais, baseadas em ácidos nucleicos, estão sendo utilizadas para a detecção da carga viral do HIV- 1: a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), o DNA ramificado (bDNA) e a amplificação baseada em ácidos nucleicos (NASBA). As metodologias baseadas em detecção de enzimas e antígenos são utilizadas em locais com recursos limitados por utilizarem equipamentos mais baratos, espaços menores e menos treinamento do pessoal de laboratório.

O grau de automação varia nas diferentes técnicas assim como os procedimentos de isolamento, amplificação e detecção. Aperfeiçoamentos têm sido feitos na sensibilidade, automação, detecção de diferentes subtipos, custos e reproducibilidade destas técnicas. A variabilidade do HIV e o surgimento de recombinantes requer constantes melhorias nestas técnicas. Indicações de que níveis bem baixos de viremia (<40 cópias/mL) podem estar associados à controle virológico sub-ótimo ou probabilidade reduzida de atingir supressão virológica (89), ou mesmo para o monitoramento de níveis baixos de viremia exigem técnicas de quantificação com sensibilidade aumentada. Para atingir um limite de sensibilidade alto, a escolha correta dos genes-alvo, dos *primers* e das sondas é crítico (90).

Enquanto a disponibilidade de técnicas diferentes com facilidades e custos distintos no mercado representa uma facilidade na implementação da quantificação da carga viral, a variabilidade entre estas técnica representa um desafio no monitoramento dos paciente HIV-

infectados. A correlação e a concordância entre estas técnicas têm sido estudadas e há estudos que relatam discordância entre os valores de carga viral produzidos por diferentes métodos.

As técnicas de quantificação tais como o NASBA, PCR tradicional (*endpoint detection*) e bDNA apresentam limitações que incluem a limitação ao grupo M, subtipo B, variação entre os diferentes métodos de quantificação, os intervalos de detecção também variam os resultados não obedecem a um padrão internacional (91-92). Estudos de comparação entre as técnicas de b-DNA e PCR mostraram uma boa correlação (93-94), ainda que os limites inferiores de detecção sejam diferentes e dificultem a reprodutibilidade nos valores mais baixos. Desde então, novas versões destes testes tem sido lançadas no mercado e necessitam ser testadas. Embora tenha sido demonstrado que a maioria destas técnicas são comparáveis, resultados individuais podem ser difíceis de interpretar, especialmente quando se trata de níveis baixos de viremia.

O conhecimento sobre o efeito das variações entre as técnicas pelo profissional clínico se faz necessário para assegurar a interpretação adequada dos resultados, que é particularmente importante quando estes estão próximos a pontos de corte utilizados para definições de rebote viral e falha virológica.

Novas técnicas de quantificação por PCR em tempo real têm sido desenvolvidas e estão recentemente estão substituindo os métodos mais antigos. Estudos demonstraram que estas técnicas têm mostrado uma melhor quantificação com um intervalo de detecção maior e abrangendo um número maior de subtipos (95-97). Porém, quando comparadas a técnicas mais antigas ou utilizadas para substituí-las, problemas na interpretação podem surgir. Amostras de pacientes que haviam atingido a supressão viral podem gerar resultados detectáveis por estas novas técnicas.

O conhecimento do tipo da técnica utilizada e o entendimento da correlação entre as técnicas são essenciais para que o acompanhamento dos pacientes não seja comprometido se houver uma mudança na metodologia utilizada em determinado laboratório ou se o paciente trocar de centro de atendimento. Para tanto, dados sobre a correlação entre estas técnicas devem ser estudados e tornados disponíveis.

Este estudo avalia a correlação entre uma versão da técnica de bDNA que já está no mercado há algum tempo e fez melhorias quanto à automação e uma técnica recentemente

introduzida no mercado. Ainda não há dados na literatura científica comparando a versões que nós utilizamos.

4 Objetivos

4.1 Objetivo principal

Comparação entre as técnicas de PCR (Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0) e DNA ramificado (Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 no sistema440).

4.2 Objetivos secundários

1. Avaliar a correlação linear entre estas técnicas de TaqMan PCR e bDNA
2. Avaliar a magnitude da concordância entre as duas técnicas considerando as diferenças esperadas entre duas técnicas diferentes ($<0.5\log_{10}$)
3. Avaliar a concordância entre estas técnicas em níveis baixos de viremia

5 Referências bibliográficas

1. Pattman R, Snow M, Handy P, Sankar KN, Elawad B. Oxford Handbook of Genitourinary Medicine, HIV, and Aids. 1st ed: Oxford University Press; 2005.
2. Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS. HIV Medicine 2007: Flying Publisher; 2007. Available from: <http://www.hivmedicine.com/hivmedicine2007.pdf>.
3. Epidemiologic Notes and Reports: Pneumocystis Pneumonia. In: CDC, editor. Los Angeles: Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention; 1981. p. 1-3.
4. Kaposi Sarcoma e Pneumocystis pneumonia among homosexual men. In: CDC, editor. New York: Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention; 1981. p. 305-8.
5. Piot P, Quinn TC. Response to the AIDS Pandemic - A Global Health Model. New England Journal of Medicine. 2013;368(23):2210-8.
6. Morison L. The global epidemiology of HIV/AIDS. British Medical Bulletin. 2001 September 1, 2001;58(1):7-18.
7. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010.2010: Available from: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/epidemiology/epidemiologyslides/>.
8. WHO HIV/AIDS Fact sheet no360. 2013; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>.
9. 10 facts on HIV/AIDS. 2011 [cited 2012 28/08/2013]; Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/hiv/en/>.
10. Global health sector strategy on hiv/aids 2011-2015. 2011 [cited 2013 02/09/2013]; Available from: http://libdoc.who.int/publications/2011/9789241501651_eng.pdf.
11. Hoffmann C, Rockstroh JK. HIV 2012/2013. Hamburg, Bonn: Medizin Fokus Verlag; 2012. Available from: <http://hivbook.files.wordpress.com/2011/10/hivbook-2012.pdf>.
12. Fauci AS, Macher AM, Longo DL, Lane HC, Rook AH, Masur H, et al. Acquired Immunodeficiency Syndrome: Epidemiologic, Clinical, Immunologic, and Therapeutic Considerations. Annals of Internal Medicine. 1984;100(1):92-106.

13. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Vande Stouwe RA, Holzman RS, et al. An Outbreak of Community-Acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 1981;305(24):1431-8.
14. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine*. 1981;305(24):1425-31.
15. Gallo RC, Montagnier L. The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(24):2283-5.
16. Sarngadharan M, Popovic M, Bruch L, Schüpbach J, Gallo R. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*. 1984 4 May 1984;224(4648):506-8.
17. Fauci A. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Nature Medicine*. 2003 July 2003;9(7):839-43.
18. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey M, Santos-Ferreira M, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986 18 July 1986;233(4761):343-6.
19. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2011 Sep 2011;1(1).
20. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, et al. Treatment with Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine in Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection and Prior Antiretroviral Therapy. *New England Journal of Medicine*. 1997;337(11):734-9.
21. Jeang K-T. HIV I: Molecular Biology and Pathogenesis: Clinical Applications. August JT, Murad F, editors: Academic Press; 2000.
22. Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*. 1986;322(6075):130-6.
23. Narayan O, Clements JE. Biology and Pathogenesis of Lentiviruses. *Journal of General Virology*. 1989 July 1, 1989;70(7):1617-39.
24. Lampejo T, Pillay D. HIV virology, testing and monitoring. *Medicine*. 2013;41(8):420-4.
25. Lever AML. HIV: the virus. *Medicine*. 2009;37(7):313-6.
26. Hirsch V M, A.Olmsted R, Murphey-Corb M, Purcell RH, R.Johnson P. An African primate lentivirus (SIVsm closely related to HIV-2). *Nature*. 1989;339(6223):389-92.
27. Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen Proteina and an RNA. *Annu Rev Biochemistry*. 1998;67:1-25.

28. Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Current opinion in infectious diseases*. 2006;19(1):1-7.
29. Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS*. 2009;23(2):147-60
30. Freed EO. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics*. 2001;26(1-6):13-33.
31. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature Medicine*. 1984 Dec 20-1985;2(312):763-7.
32. Deng H, Liu R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature Medicine*. 1996 20 June 1986;381: 661 - 6.
33. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996 May 10 1996;272(5263):872-7.
34. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolins C, N. Ruffing, et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*. 1996 14 November 1996; 384:179 - 83.
35. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology*. 1999 April 1999;17.
36. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 Pathogenesis: The Virus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012 December 1, 2012;2(12).
37. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.
38. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(7):692-8.
39. Gilliam BL, Riedel DJ, Redfield RR. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *Translational Medicine*. 2011;S9(Suppl 1).
40. Parra J, Portilla J, Pulido F, Rosa RS-dl, Alonso-Villaverde C, Berenguer J, et al. Clinical Utility of Maraviroc. *Clinical Drug Investigation*. 2011 August 2011;31(8):527-42.
41. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*. 2003;9(7):853-60.

42. Peliska JA, Benkovic SJ. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1992;258(5085):1112-8.
43. Simon V, D'Ho D, Karim QA. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*. 2006;368(9534):489-504.
44. Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 2011. [Review]. 2011 25/10/2010;6:223-48.
45. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2013;8(4):311-7.
46. Deeks SG, Walker BD. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity*. 2007;27(3):406-16.
47. Lewthwaite P, Wilkins E. Natural history of HIV/AIDS. *Medicine*. 2009;37(7):333-7.
48. Gaur AH, Dominguez KL, Kalish ML, Rivera-Hernandez D, Donohoe M, Brooks JT, et al. Practice of Feeding Premasticated Food to Infants: A Potential Risk Factor for HIV Transmission. *Pediatrics*. 2009 August 1, 2009;124(2):658-66.
49. Bartholomew CF, Jones AM. Human bites: a rare risk factor for HIV transmission. *AIDS*. 2006;20(4):631-2.
50. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(5):327-35.
51. Weber J. The pathogenesis of HIV-1 infection. *British Medical Bulletin*. 2001 September 1, 2001;58(1):61-72.
52. O'Cofoigh E, Lewthwaite P. Natural history of HIV and AIDS. *Medicine*. 2013;41(8):411-6.
5360. Cadogan M, Dalglish AG. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(11):675-84.
5461. Fauci A. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease: The Role of Viral Replication and Immune Activation. *Retrovirology*. 2005;2(Suppl 1):S109.
5562. Geretti AM. HIV testing and monitoring. *Medicine*. 2009;37(7):326-9.
5663. Zuckerman M, Pillay D. HIV testing and monitoring. *Medicine*. 2005;33(6):8-10.
5764. Cornett JK, Kirn TJ. Laboratory Diagnosis of HIV in Adults: A Review of Current Methods. *Clinical Infectious Diseases*. 2013 May 10, 2013.
5865. Detection of Acute HIV Infection in Two Evaluations of a New HIV Diagnostic Testing Algorithm — United States, 2011–2013. In: *MMWR* C, editor.: *CDC Weekly*; 2013. p. 489-94.

59. Pierce VM, Neide B, Hodinka RL. Evaluation of the Gen-Probe Aptima HIV-1 RNA Qualitative Assay as an Alternative to Western Blot Analysis for Confirmation of HIV Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 April 1, 2011;49(4):1642-5.
60. Guidelines for the management of HIV infection in pregnant women 2012. In: (BHIVA) BHA, editor.: BHIVA.
61. Williams IG. Treatment strategies for HIV infection. *Medicine*. 2013;41(8):470-3.
62. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012 April 1, 2012;2(4).
- 70.
7663. Rong L, Perelson AS. Modeling HIV persistence, the latent reservoir, and viral blips. *Journal of Theoretical Biology*. 2009;260(2):308-31.
64. Monitoring the response to ART and the diagnosis of treatment failure: New recommendations in Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. In: Department HA, editor. Geneva -Switzerland: World Health Organization; 2013.
65. de Wolf F, Lange JMA, Houweling JTM, A.Coutinho R, T.Scbellekens P, Noordaa Jvd, et al. Numbers of CD4+ Cells and the Levels of Core Antigens of and Antibodies to the Human Immunodeficiency Virus as Predictors of AIDS Among Seropositive Homosexual Men. *Journal of Infectious Diseases*. 1988 September 1, 1988;158(3):615-22.
66. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, et al. Changes in Plasma HIV-1 RNA and CD4+ Lymphocyte Counts and the Risk of Progression to AIDS. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(7):426-31.
67. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Annals of Internal Medicine*. 1995 April 15, 1995;122(8):573-9.
68. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science*. 1996 May 24, 1996;272(5265):1167-70.
69. Ghani AC, de Wolf F, Ferguson NM, Donnelly CA, Coutinho R, Miedema F, et al. Surrogate Markers for Disease Progression in Treated HIV Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2001;28(3):226-31.
70. Egger M, May M, Chêne G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *The Lancet*. 2002 13 July 2002;360(9327):119-29.
71. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for

Determination of HIV-1 Viral Loads in a Cohort of Canadian Patients with Diverse HIV Subtype Infections. *J Clin Microbiol.* 2011 January 1, 2011;49(1):118-24.

72. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. *Annals of internal medicine.* 1997;126(12):929-38.

73. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD. Changes in Plasma HIV RNA Levels and CD4+ Lymphocyte Counts Predict Both Response to Antiretroviral Therapy and Therapeutic Failure. *Annals of Internal Medicine.* 1997 June 15, 1997;126(12):939-45.

74. Collaboration TATAC. Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: analysis of prospective studies. *Lancet.* 2003;362:679-86.

75. Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JCC, Wijnholds F-J, de Vos NM, Nottet HSLM, et al. Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases.* 1998 November 1, 1998;178(5):1279-87.

76. Arnaout RA, Lloyd AL, O'Brien TR, Goedert JJ, Leonard JM, Nowak MA. A simple relationship between viral load and survival time in HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999 September 28, 1999;96(20):11549-53.

77. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, et al. Monitoring Plasma HIV-1 RNA Levels in Addition to CD4+ Lymphocyte Count Improves Assessment of Antiretroviral Therapeutic Response. *Annals of Internal Medicine.* 1997 June 15, 1997;126(12):929-38.

78. de Wolf F, Spijkerman I, Schellekens PT, Langendam M, Kuiken C, Bakker M, et al. AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *AIDS.* 1997;11(15):1799-806.

79. Henrard DR, Daar E, Farzadegan H, Clark SJ, Phillips J, Shaw GM, et al. Virologic and Immunologic Characterization of Symptomatic and Asymptomatic Primary HIV-1 Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 1995;9(3):305-10.

80. Best SJ, Gust AP, Johnson EIM, McGavin CH, Dax EM. Quality of Human Immunodeficiency Virus Viral Load Testing in Australia. *J Clin Microbiol.* 2000 November 1, 2000;38(11):4015-20.

81. Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, et al. Antiretroviral Therapy for HIV Infection in 1998. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1998 July 1, 1998;280(1):78-86.

82. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):123-6.
83. Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Vézinet FB, Clotet B, Hammer SM, et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clinical Infectious Diseases*. 2008 July 15, 2008;47(2):266-85.
84. Walker AS, Gibb DM. Monitoring of highly active antiretroviral therapy in HIV infection. *Current opinion in infectious diseases*. 2011;24(1):27-33.
85. Srithanaviboonchai K, Rungruengthanakit K, Nouanthong P, Pata S, Sirisanthana T, Kasinrerk W. Novel low-cost assay for the monitoring of CD4 counts in HIV-infected individuals. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2008;47(2):135-9.
86. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *The Lancet*. 2010;376(9734):49-62.
87. Gaur AH, Flynn PM, Bitar W, Liang H. Optimizing Frequency of CD4 Assays in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2013;29(3):418-22.
88. Gale HB, Gitterman SR, Hoffman HJ, Gordin FM, Benator DA, Labriola AM, et al. Is Frequent CD4+ T-Lymphocyte Count Monitoring Necessary for Persons With Counts ≥ 300 Cells/ μ L and HIV-1 Suppression? *Clinical Infectious Diseases*. 2013 May 1, 2013;56(9):1340-3.
89. Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L, Icard V, Saoudin H, Trabaud M-A, et al. HIV-1 Load Comparison Using Four Commercial Real-Time Assays. *J Clin Microbiol*. 2011 January 1, 2011;49(1):292-7.
90. Garcia-Diaz A, Clewley GS, Booth CL, Labett W, McAllister N, Geretti AM. 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*. 2006 May 1, 2006;44(5):1788-91.
91. De Bel A, Marissens D, Debaisieux L, Liesnard C, Van den Wijngaert S, Lauwers S, et al. Correction of Underquantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Load with the Second Version of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan Assay. *J Clin Microbiol*. 2010 April 1, 2010;48(4):1337-42.
92. Damond F, Roquebert B, Bénard A, G. Collin, Miceli M, Yéni P, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Plasma Load Discrepancies between the Roche COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Version 1.5 and the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Assays. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3436-8.

93. Nolte FS, Boysza J, Thurmond C, Clark WS, Lennox JL. 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.* 1998 March 1, 1998;36(3):716-20.
94. 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. *Journal of Clinical Virology.* 2005;34(4):245-52.
95. Crump JA, Scott LE, Msuya E, Morrissey AB, Kimaro EE, Shao JF, et al. Evaluation of the Abbott m2000rt RealTime™ HIV-1 assay with manual sample preparation compared with the ROCHE COBAS® AmpliPrep™/AMPLICOR™ HIV-1 MONITOR® v1.5 using specimens from East Africa. *Journal of Virological Methods.* 2009;162(1-2):218-22.
96. Gueudin M, Plantier JC, Lemée V, Schmitt MP, Chartier L, Bourlet T, et al. Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime Extraction-Quantification Systems for HIV-1 Subtypes. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 2007;44(5):500-5
97. Swanson P, Huang S, Abravaya K, de Mendoza C, Soriano V, Devare SG, et al. 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. *Journal of Virological Methods.* 2007;141(1):49-57.

6 Artigos em inglês

6.1 Artigo de Revisão da Literatura

Manuscrito para submissão ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

HIV-1 Viral Load Quantification methods

Daniela Ferreira Passos^a, Kavin Abelak^b, Sandra Leistner Segal^a.

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brazil.

^b HIV/GUM Research Laboratory. Chelsea and Westminster Hospital . London, United Kingdom.

Key words: HIV- viral load – methods- quantification

Abstract

The HIV viral load quantification is a direct measure of viraemia and it is a predictor of disease progression. It represents an essential tool to monitor treated and non-treated HIV-infected patients. Several different methodologies are available to quantify the HIV viral load; a number of them are based on nucleic acid detection and others in detection of enzymes and antigens. Automation is also variable among these methods in addition to differences in isolation, amplification and detection. Several studies have been carried out to evaluate their correlation. The goal of this paper is to review the main commercially available methods, how they work and how they correlate. The available methodologies vary in a series of aspects such as the HIV genome region they target, dynamic range, sensitivity, subtype detection and detection limits. Although discordance has been shown, the overall agreement is good. However, the awareness about the differences should be taken in to account when analysing viral load results. We suggest that the monitoring of a single patient must be done using consistently the same methodology to avoid potential interpretation problems. We also emphasize that the clinician must have knowledge about the variability among different techniques and keep close contact with the laboratory staff.

Introduction

Upon transmission, the Human Immunodeficiency Virus (HIV) disseminates through the lymphoid system, generating a peak of viraemia and a depletion of the CD4+ T-cells characteristic of acute infection (1). This stage is followed by re-establishment of the immune system and a decline of the viraemia until it stabilises to a set point (2). The set point is associated with clinical outcome, where a higher set point leads to more rapid disease progression (3-5). In the last stage of HIV infection, the CD4+ T-cell levels fall considerably, thereby increasing the susceptibility to opportunistic infections and AIDS-related malignancies (1).

The maintenance of viraemia in HIV-infected individuals depends on a continuously high rate of viral production through replication and accelerated cell turnover (6-7). The increased viral production leads to the destruction of the CD4+ T cells, the primary target of HIV (8). The HIV viral load is a direct measure of viraemia whereas the CD4 count is a valuable tool to evaluate the immune status and the risk of acquiring opportunistic infections (9). The quantification of viraemia is a well-recognized predictor of disease progression (3, 10). Whilst the viral load is the best surrogate marker for disease progression, its use in conjunction with the CD4 counts has an important role in guiding clinicians on the management of treated and non-treated HIV infection (9, 11-12).

The introduction of HAART (highly active antiretroviral therapy) has dramatically changed the course of HIV infection (13-14). Global efforts to make the antiretroviral therapy (ART) widely available have reduced the symptoms of AIDS. However other concerns have been raised (15): virological failure, lack of adherence to treatment, resistance to antiretroviral drugs, toxicity and other adverse effects are major concerns that must be monitored and handled accordingly (16). The main goal of antiretroviral therapy is to suppress viral replication, thereby decreasing viraemia and leading the viral load counts to undetectable levels (17). Thus, the viral load is the best measure for HAART success or failure.

Viral Load Quantification

The quantification of HIV RNA was initially used in clinical trials to measure the replication rate. Its value in clinical practice started to be appreciated in the mid 90's (18). Since then, it has been used to: 1) assess the risk for disease progression in non-treated

individuals, 2) help determining the moment to start therapy, 3) assess initial response to treatment, 4) identify lack of adherence (19), virological failure and the need of regimen change (20), 5) determine blip rates and risk of viral rebound (21) and 6) diagnose HIV infection in infants (22). Viral load determinations may also predict the likely success or failure rate of complementary diagnostic assays such as tropism, resistance test and pro-viral DNA which require viral loads of at least 500-1000 copies/mL (Volberding 2010, Tsoukas 1994). The viral load measurements are expressed in copies of HIV RNA per mL of plasma and transformation to \log_{10} can be used to facilitate result interpretation. A reduction in viral load of 0.5-1.0 \log_{10} might be related to slower disease progression, whilst a reduction of 1 \log_{10} within the first month after start of HAART has been associated with adequate response to treatment. The interpretation of viral load results can be difficult and is complicated by an acceptable variation among technologies of up to $\pm 0.5 \log_{10}$ (23).

It is imperative that the clinician understands the assay used to assess the viral load as well as host and viral factors that may affect the result, such as infection stage (11), recent vaccination, concomitant infections and limitations in viral subtype detection (24-26). New technologies and new versions of existent assays are constantly being developed and approved and hence comparative studies are essential to evaluate the correlation between them.

A viral load test must be done at diagnosis and at each follow-up visit. In treatment-naïve patients, two viral load measures are necessary to establish the set point. Subsequently, the viral load must be tested every six months for clinically-stable patients. Before the start of the ART, the viral load must be measured at baseline. To evaluate the treatment outcome, the viral load should be measured at week 4, 12 and 24 after starting ART and thereafter every 3-4 months (27).

HIV viral load quantification assays

Several commercially available technologies are used to quantify the viral load (Table 1). This paper reviews the main commercially available methodologies to quantify HIV-1 viral load.

Table 1. Commercially available assays for quantification of HIV-1 viral load

HIV viral load quantification assays						
	Type	Assay name	Target	Linear range (copies/mL)	Group/Subtype detection	
NAT	bDNA	VERSANT HIV-1 v3.0 (Siemens)	pol	50-500,000	M (A-G)	
	NASBA	NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 (bioMerieux)	gag	100-3 million	M (A-D)	
	RT-PCR		Amplicor HIV-1 Monitor v1.5 COBAS® Amplicor HIV-1 Monitor v1.5 (Roche Molecular Systems)	gag p24	400-750,000 (standard)\ 50-100,000 (ultrasensitive)	M
			COBAS® TaqMan (Roche Molecular Systems)	gag and LTR	40-10 million	M (A-H), O
			RealTime HIV-1 (Abbott)	pol integrase gene	40-10 million	M (A-H), N and O
			VERSANT HIV-1 RNA 1.0 assay (kPCR) (Siemens)	pol gene	31-11 million	M, O
Non-NAT	Reverse Transcriptase	ExaVir Load (Cavidi ab)	RT	200 to 600, 000	All	

	P24	Ultrasensitive, Heat denatured p24 antigen quantification assay (Perkin Elmer Life Sciences)	p24	~5,000-30,000	All
--	-----	--	-----	---------------	-----

The HIV-1 viral load assays can be categorized into two distinct groups: Nucleic Acid Testing (NAT) and non-Nucleic Acid Testing (non-NAT). The NAT group comprises the branched-DNA, NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) and RT-PCR approaches to quantify the HIV RNA. Within the RT-PCR assays there are differences concerning the methods of extraction, amplification and detection. The non-NAT technologies quantify HIV-specific enzymes and proteins instead of nucleic acids.

NAT Technologies

bDNA technology

The branched-DNA VERSANT HIV-1 RNA 3.0 is a method based on signal amplification rather than nucleic acid amplification. The HIV gene targeted in this method is the pol gene. The plasma is concentrated by centrifugation; this method does not require RNA extraction. The virions are lysed and the RNA is captured in microwells with synthetic oligonucleotide probes. The signal is amplified by a series of hybridization reactions: the target probes hybridise with the RNA; the preamplifier probes hybridise with the amplifier probes forming a bDNA and this complex hybridises to the alkaline phosphatase labelled probe. The final step is the detection of the amplified signal by adding a chemoluminescent substrate which results in a light emission proportional to the amount of signal. This light emission is read by the equipment through an algorithm that compares it to the control samples and transforms in number of copies (23, 28-31). The hybridisation steps are performed on the VERSANT 440 analyser. The reagent preparation and delivery is automated in contrast with the previous 340 version. The VERSANT HIV-1 RNA 3.0 correlates well with the COBAS® AMPLICOR HIV-1 (32-36), there is evidence that bDNA is more reliable when discriminating viral suppression from low-level viraemia in stable patients on ART (37). Nevertheless, discrepancies have been reported among non-B subtypes when compared with COBAS® TaqMan v1.0 and Easy Q v1.2 (38-39).

NASBA

The NASBA is an isothermal nucleic acid amplification reaction in which the target RNA is exponentially amplified by a three-enzyme (reverse transcriptase (RT), RNase and T7 RNA polymerase) and two-primer system. The RNA can be extracted manually or with the Nuclisens extractor. The first primer – complementary to the target RNA and also

containing a T7 RNA sequence – anneals to the RNA. The primer is extended by the RT resulting in a cDNA hybrid which is degraded by the RNase H enabling the annealing of the second primer and extension by the RT. The result is a double stranded DNA containing a template for transcription and a promoter for T7 to generate many multiple new copies complementary to the target RNA. At this point the amplification reaches the cyclic phase. Each new copy anneals with the second primer forming a hybrid that will be degraded by the RNase H. Another copy anneals with the first primer and the double strand will allow the synthesis of several new copies of RNA. The result of the cyclic phase is the exponential production of new copies of RNA and DNA. The quantification is performed through a co-amplification with the internal calibrators. The detection occurs at the end of the amplification using electrochemoluminescent probes (30, 40). The Nuclisens Easy Q v1.1 is comparable to the COBAS® Amplicor Monitor v 1.5 and Versant 3.0 (41). When compared to real-time PCR methods, the Nuclisens Easy Q v1.2 showed an under-quantification of samples and false-negative results (38, 42), as well as discrepancies regarding subtypes detection (26, 43-44).

PCR technologies

The RT-PCR approaches amplify the nucleic acids sequences by reverse transcriptase polymerase chain reaction. There are two approaches to detection: endpoint which occurs at the end of the amplification, or real-time in which the detection occurs as the product accumulate during the amplification process. The Amplicor HIV-1 Monitor v 1.5 uses the endpoint approach, whereas the COBAS® TaqMan, RealTime HIV-1 and VERSANT HIV-1 RNA 1.0 assay (kPCR) are real-time detection assays. Comparison studies have found a good correlation between endpoint and real-time detection assays (45). However, the real time assays have demonstrated a better sensitivity and lower detection limits (46-47), which has been a problem when interpreting low-level viral load results that used to be undetectable when assessed by less sensitive methods (48-49).

Roche Amplicor

Roche has developed different PCR based technologies and platforms for the quantification of the HIV-1 viral load. The Roche AMPLICOR HIV-1 Monitor v 1.5 is a mostly manual PCR based viral load test. The RNA isolation is manual and the reverse transcription - using a biotin labelled reverse primer and a thermostable *Thermus*

thermophilus DNA polymerase – is performed on a regular thermal cycler. After amplification, the samples and controls are added to a microtiter plate for the hybridization of amplicons with the specific labelled probes and subsequent detection by enzyme immunoassay using an ELISA reader/washer (30). Conversely, the COBAS® variant of the assay is mostly automated. It comprises the same steps except the amplification and the detection are performed on the COBAS® AMPLICOR analyser which acts as a thermal cycler, automatic pipettor, incubator, washer and reader. The COBAS® AMPLICOR analyser estimates the HIV-1 RNA levels in the samples by comparing the HIV-1 signal to the HIV-1 standard signal for each specimen and control. (29, 50). Both Roche AMPLICOR HIV-1 Monitor v 1.5 and Roche COBAS® AMPLICOR HIV-1 v 1.5 Monitor target the same gag p24 region of the HIV-1 genome and can be used with two different specimen procedures: ultrasensitive - which requires an ultracentrifugation step during the RNA isolation - or standard. The Roche AMPLICOR HIV-1 Monitor 1.5 was generally considered the gold standard in viral load quantification tests for many years but it has already been discontinued.

The Roche COBAS® TaqMan is a real-time PCR based test with a dual-target approach: it targets the gag gene and the LTR regions of the HIV genome, that are detected simultaneously (51). The use of the COBAS® AmpliPrep System, which is a sample preparation/extraction system, and the COBAS® Taqman analyzer means it is fully automated. There are two great advantages over the AMPLICOR system: complete automation and lower detection limit due to the use of two amplification targets (52). A good correlation has been shown between the Roche COBAS® TaqMan v2.0, Roche COBAS® TaqMan v1.0, and Abbot Real Time HIV-1 (44, 53-57). Underquantification of subtypes B and non-B were reported when the Roche COBAS® TaqMan v1.0 was compared to the COBAS® Amplicor HIV-1 Monitor v 1.5 (58-59), however this problem has been resolved on version 2.0 (60-61).

Abbott RealTime HIV-1

The Abbott RealTime HIV-1 is also a real-time PCR assay. An internal control not related to the HIV target sequence . is incorporated with each specimen during sample preparation. The detection is possible through hybridisation with probes labelled with fluorescent dyes (62). It has been designed to be performed on the automated *m2000sp* system and it has three alternative methods for sample preparation: manual, using the *m24sp*

equipment or the *m2000sp* machine. The *m24sp* equipment automates the sample purification whilst with *m2000sp* the sample preparation and the RNA extraction are automated. The amplification and detection is made on the *m2000rt* system. Some studies have demonstrated that this assay is superior in detection HIV-1 group O and N than VERSANT HIV-1 v3.0 b-DNA and Amplicor HIV-1 Monitor v1.5 (63-64). A good level of agreement with Roche COBAS® TaqMan was observed (44, 53-57).

HIV-1 RNA 1.0 assay (kPCR)

The VERSANT HIV-1 RNA 1.0 assay (kPCR) is based on the kinetic PCR molecular system. The system is mostly automated, reducing the likelihood of human error, and consists of two modules: one for the extraction of RNA from plasma samples and the other for amplification. The RNA is extracted, lysed and washed and eluted. On the amplification module, the purified RNA is added to a plate containing the primer/probe mix and the enzymes. The samples and controls are then transcribed into cDNA and amplified. The detection is based on a fluorescent signal release when an fluorescent dye-labelled probe hybridises with the amplicon (62). This assays has shown to be comparable to the COBAS® TaqMan v 2.0 and Abbot RealTime (65).

non-NAT technologies

The non-NAT assays have the advantage of being less demanding with regards to expensive equipment and reagents, laboratory space and laboratory personnel skills (66-67), representing a good alternative in low-resource settings.

ExaVir Load (Cavidi ab)

The ExaVir Load (Cavidi) reverse transcriptase viral load assay quantifies the reverse transcriptase (RT) activity (66). The first step is the separation of the viral particles from the plasma through a gel column. The virions are lysed and the lysate added to a solution containing an RNA template, a primer, and an RT substrate. The RT on the lysate will synthesise a DNA strand that will be detected by a monoclonal antibody in the presence of a colorimetric substrate. The detection is done by comparing the patient sample to a standard of a known concentration. Despite the labour intensity, this method is easy to perform and requires inexpensive equipment which makes it suitable for low-resource settings. It has been

shown to correlate well with Roche Cobas Amplicor assay (68-70) and real-time molecular assays (71).

Ultrasensitive p24 antigen quantification assay

The Ultrasensitive p24 antigen quantification assay uses a standard immunoenzymatic assay coupled with an amplification step to increase sensitivity. The plasma is heat denatured before binding of p24 antigen to denature antibodies and dissociate immune complexes that might compete for binding (72). This method is no longer being developed for viral load monitoring however it has been used as an alternative to diagnosis in early infancy (66, 72). The dynamic range (10,000-30,000) is not adequate to evaluate the detection of early treatment failure and low-level viraemia (66).

Discussion

The viral load has been shown to be a valuable tool to help clinicians in the monitoring of HIV-infected patients, hence accurate quantification is critical to ensure correct management, diagnosis and treatment decisions. Simplicity of use, sensitivity, specificity, reliability, availability and cost per test are determining features when selecting an assay (73). Significant differences ($\geq 0.5\log$) in reported values, observed when comparing the performance of a number of viral load assays, may cause problems on the interpretation of the viral load results in the clinic. Such differences may lead to erroneous decisions regarding treatment initiation and monitoring. Caution regarding especially lower end values must be applied when switching between assays or conferring a particular significance to any single viral load result. The knowledge of the method used to quantify the viral load when evaluating disease progression and treatment outcome in HIV-infected patients as well as the awareness of the differences between them is essential.

The sources of the discrepancies in viral load results are intra and inter-assay variability as well as the influence of biological factors. Although all the methodologies discussed above are shown to be comparable, individual results might show discrepancies. The intra-assay variability has been reduced by the increasing automation of the quantification methodologies. Even with the increase of automation, pre-analytic factors such as sample handling and preparation may also have a part in this variability. Several studies reviewed the use of different anticoagulants and blood products and there is a consensus for the use of plasma EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (29,73-74), although some

technologies have shown comparable results with acid citrate dextrose or heparin plasma (NASBA) or plasma preparation tubes (PPTTM) (bDNA) (74). The centrifugation time and speed may also affect the results (74). The variability among assays is due to differences in some aspects of these assays such as target region within the HIV genome, subtypes detection, sensitivity, dynamic range and detection limits. Regarding biological factors, the emerging HIV genomic variability demands constant improvement of detection (51).

Advances have been made to improve sensitivity, automation, subtype detection, costs and reproducibility among different HIV-1 viral load quantification assays (31, 51, 60). However, the variability among techniques remains a challenge in clinical practice (49).

NASBA, conventional PCR and bDNA have shown limitations when applied to single HIV groups or subtypes (75,76). Comparison studies between b-DNA and PCR methods have shown a good correlation (32,77). Several authors highlighted the issue of subtype detection and suggested that the population diversity should be considered when comparing the results of different techniques (39,78-79). Real-time PCR assays show improved performance characteristics regarding sensitivity, detection intervals and identification of subtypes (59, 63, 80).

In the lack of a gold standard, these real-time assays have been compared to more established techniques. Recently, more sensitive real-time PCR-based assays have been shown to overquantify low-level viraemia (49, 81). This overquantification is likely to be attributed to the higher sensitivity shown by these newer techniques and must not be seen as a negative feature; however it might cause trouble in the interpretation especially when low-level viraemia is concerned.

The clinical significance of low-level viraemia remains elusive, making the interpretation of such results a challenge in clinical practice. When comparing different assays, special attention must be paid to the level of correlation for low viral load results. Attention is particularly needed at the cut-off points for low-level viraemia, viral rebound and virological failure. Low-level viraemia is usually defined as 50-1000 copies/mL and may indicate treatment failure (82,83). The definition of virological failure varies among guidelines, it may be defined as a viral load above 500 copies/ml or clinical progression (84) or two consecutive results above 1000 copies/mL within a 3-month period (85). Viral rebounds between 51 and 500 copies/mL may occur in patients who had achieved an

undetectable viral load; they are often transient (blips) and only in approximately 10% evolve to virological failure if treatment is not switched (83,86). Conversely, blips of 500–999 copies/mL were associated with virological failure (86). Persistent low-level viraemia may be predictive of future suboptimal virological control (87).

A recent data suggested that a low-but-detectable viral load of 250 copies/mL for the Taqman (COBAS® TaqMan, Roche Molecular Systems) assay results is not an indicator of virological failure (88,89) and residual viraemia by kPCR (Versant HIV-1 RNA kPCR 1.0; Siemens Diagnostics) was not associated with virological rebound during first year of follow-up (90). The use of real-time PCR assays for HIV quantification tends to rise on the next few years therefore guidelines will be required to adapt to the use of these more sensitive techniques.

Previous studies which suggest that viral load quantification of a patient should be performed in a single laboratory and with the same quantification technology (38, 54, 91). However, in practice this might not be possible due to patient migration, cost pressures and the need of updated versions of the assays. O’Shea et al (2000) (92) emphasizes the importance of good communication between the laboratory and the clinic in overcoming problems in the interpretation of viral load results. Any change of methodology must be discussed with the clinic and the problems must be foreseen.

References

1. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(5):327-35.
2. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, Blattner WA, Wiesner D, Eyster ME, et al. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 1995;274(7):554-8.
3. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science*. 1996 May 24, 1996;272(5265):1167-70.
4. Lefrère J-J, Françoise R-T, Mariotti M, Thauvin M, Joelle L, Salpérier J, et al. The risk of disease progression is determined during the first year of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(6):1541-8.

5. Lavreys L, Baeten JM, Chohan V, McClelland RS, Hassan WM, Richardson BA, et al. Higher set point plasma viral load and more-severe acute HIV type 1 (HIV-1) illness predict mortality among high-risk HIV-1-infected African women. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(9):1333-9.
6. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):117-22.
7. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):123-6.
8. Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JCC, Wijnholds F-J, de Vos NM, Nottet HSLM, et al. Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1998 November 1, 1998;178(5):1279-87.
9. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, et al. Plasma Viral Load and CD4+ Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection. *Annals of internal medicine*. 1997;126(12):946-54.
10. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Annals of Internal Medicine*. 1995 April 15, 1995;122(8):573-9.
11. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD. Changes in Plasma HIV RNA Levels and CD4+ Lymphocyte Counts Predict Both Response to Antiretroviral Therapy and Therapeutic Failure. *Annals of Internal Medicine*. 1997 June 15, 1997;126(12):939-45.
12. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. *Annals of internal medicine*. 1997;126(12):929-38.
13. Moore RD, Chaisson RE. Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids*. 1999;13(14):1933-42.
14. Jacobson MA, French M. Altered natural history of AIDS-related opportunistic infections in the era of potent combination antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)*. 1998;12:S157.
15. Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 2011. [Review]. 2011 25/10/2010;6:223-48.
16. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *The Lancet*. 2010;376(9734):49-62.

17. Williams IG. Treatment strategies for HIV infection. *Medicine*. 2013;41(8):470-3.
18. Saag MS. Use of HIV Viral Load in Clinical Practice: Back to the Future. *Annals of internal medicine*. 1997;126(12):983-5.
19. Bonner K, Mezocho A, Roberts T, Ford N, Cohn J. Viral load monitoring as a tool to reinforce adherence: a systematic review. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;64(1):74-8.
20. Murray JS, Elashoff MR, Iacono-Connors LC, Cvetkovich TA, Struble KA. The use of plasma HIV RNA as a study endpoint in efficacy trials of antiretroviral drugs. *Aids*. 1999;13(7):797-804.
21. Grennan JT, Loutfy MR, Su D, Harrigan PR, Cooper C, Klein M, et al. Magnitude of virologic blips is associated with a higher risk for virologic rebound in HIV-infected individuals: a recurrent events analysis. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(8):1230-8.
22. Neshein S, Palumbo P, Sullivan K, Lee F, VINK Vink P, Abrams E, et al. Quantitative RNA testing for diagnosis of HIV-infected infants. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2003;32(2):192-6.
23. Clarke JR, McClure MO. HIV-1 viral load testing. *Journal of Infection*. 1999;38(3):141-6.
24. Churchill D, Weber J. Measurement of plasma HIV viral load — Clinical applications. *Journal of Infection*. 1999;38(3):147-50.
25. Luft LM, Gill MJ, Church DL. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(10):e661-e70.
26. Alaeus A, Lidman K, Sönerborg A, Albert J. Subtype-specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA. *Aids*. 1997;11(7):859-65.
27. Asboe D, Aitken C, Boffito M, Booth C, Cane P, Fakoya A, et al. British HIV Association guidelines for the routine investigation and monitoring of adult HIV-1-infected individuals 2011. *HIV Medicine*. 2012;13(1):1-44.
28. Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C-a, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Research*. 1997 August 1, 1997;25(15):2979-84.
29. Ginocchio CC. HIV-1 Viral Load Testing: Methods and Clinical Applications. *Lab Medicine*. 2001 March 1, 2001;32(3):142-52.
30. Zuckerman M, Pillay D. HIV testing and monitoring. *Medicine*. 2005;33(6):8-10.
31. Tsongalis GJ. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *American journal of clinical pathology*. 2006;126(3):448-53.

32. 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. *Journal of Clinical Virology*. 2005;34(4):245-52.
33. Murphy DG, 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. *Journal of clinical microbiology*. 2000 November 1, 2000;38(11):4034-41.
34. Elbeik T, Charlebois E, Nassos P, Kahn J, Hecht FM, Yajko D, et al. Quantitative and cost comparison of ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 RNA viral load assays: Bayer bDNA quantiplex versions 3.0 and 2.0 and Roche PCR Amplicor monitor version 1.5. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(3):1113-20.
35. Erice A, Brambilla D, Bremer J, Jackson JB, Kokka R, Yen-Lieberman B, et al. Performance characteristics of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 3.0 assay for detection and quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(8):2837-45.
36. Anastassopoulou CG, Touloumi G, Katsoulidou A, Hatzitheodorou H, Pappa M, Paraskevis D, et al. Comparative evaluation of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 and 3.0 (bDNA) assays and the AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1. 5 test for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of virological methods*. 2001;91(1):67-74.
37. Lubelchek RJ, Max B, Sandusky CJ, Hota B, Barker DE. Reliability at the lower limits of HIV-1 RNA quantification in clinical samples: a comparison of RT-PCR versus bDNA assays. *PloS one*. 2009;4(6):e6008.
38. Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V. Performance of Three Commercial Viral Load Assays, Versant Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, Testing HIV-1 Non-B Subtypes and Recombinant Variants. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 September 2008;46(9):2918-23.
39. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1. 0, Easy Q v1. 2, and Versant v3. 0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(1):118-24.
40. Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular biotechnology*. 2002;20(2):163-79.
41. de Mendoza C, Koppelman M, Montes B, Ferre V, Soriano V, Cuypers H, et al. Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1. 1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *Journal of virological methods*. 2005;127(1):54-9.

42. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for Determination of HIV-1 Viral Loads in a Cohort of Canadian Patients with Diverse HIV Subtype Infections. *J Clin Microbiol.* 2011 January 1, 2011;49(1):118-24.
43. Gottesman BS, Grossman Z, Lorber M, Levi I, Shitrit P, Katzir M, et al. Comparative Performance of the Amplicor HIV-1 monitor assay versus NucliSens EasyQ in HIV subtype C-infected patients. *Journal of medical virology.* 2006;78(7):883-7.
44. Scott LE, Noble LD, Moloi J, Erasmus L, Venter WD, Stevens W. Evaluation of the Abbott m2000 realtime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 assays. *Journal of clinical microbiology.* 2009;47(7):2209-17.
45. Khopkar P, Mallav V, Chidrawar S, Kulkarni S. Comparative Evaluation of the Abbott HIV-1 RealTime™ assay with the Standard Roche COBAS® Amplicor™ HIV-1 Monitor®Test, v1. 5 for determining HIV-1 RNA Levels in Plasma specimens from Pune, India. *Journal of virological methods.* 2013.
46. Palmer S. Advances in detection and monitoring of plasma viremia in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;8(2):87-92.
47. Oliver AR, Pereira SF, Clark DA. Comparative evaluation of the automated Roche TaqMan real-time quantitative human immunodeficiency virus type 1 RNA PCR assay and the Roche AMPLICOR Version 1.5 conventional PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* 2007;45(11):3616-9.
48. Garrett NJ, Apea V, Nori A, Ushiro-Lumb I, Oliver AR, Baily G, et al. Comparison of the rate and size of HIV-1 viral load blips with Roche COBAS TaqMan HIV-1 versions 1.0 and 2.0 and implications for patient management. *Journal of Clinical Virology.* 2012;53(4):354-5.
49. Yan CS, Hanafi I, Kelleher AD, Carr AD, Amin J, McNally LP, et al. Lack of correlation between three commercial platforms for the evaluation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load at the clinically critical lower limit of quantification. *Journal of Clinical Virology.* 2010;49(4):249-53.
50. Wittek M, Stürmer M, Doerr HW, Berger A. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2007;7(3):237-46.
51. Pyne MT, Brown KL, Hillyard DR. Evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test and Identification of Rare Polymorphisms Potentially Affecting Assay Performance. *J Clin Microbiol.* 2010 August 1, 2010;48(8):2852-8.

52. Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babel R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® system. *Journal of Clinical Virology*. 2007;38(4):304-12.
53. Wojewoda CM, Spahlinger T, Harmon ML, Schnellinger B, Li Q, Dejelo C, et al. Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 (CAP/CTM v2. 0) with other real-time PCR assays in HIV-1 monitoring and follow-up of low-level viral loads. *Journal of virological methods*. 2012.
54. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2. 0 in HIV-1 positive patients with low viral load: a comparative study. *Journal of virological methods*. 2011;173(2):399-402.
55. Sloma CR, Germer JJ, Gerads TM, Mandrekar JN, Mitchell PS, Yao JD. Comparison of the Abbott RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay to the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test: workflow, reliability, and direct costs. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(4):889-95.
56. Pas S, Rossen JW, Schoener D, Thamke D, Pettersson A, Babel R, et al. Performance evaluation of the new Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(4):1195-200.
57. Karasi JC, Dziezuk F, Quennery L, Förster S, Reischl U, Colucci G, et al. High correlation between the Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2. 0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *Journal of Clinical Virology*. 2011;52(3):181-6.
58. Damond F, Roquebert B, Bénard A, G. Collin, Miceli M, Yéni P, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Plasma Load Discrepancies between the Roche COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Version 1.5 and the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Assays. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3436-8.
59. Gueudin M, Plantier JC, Lemée V, Schmitt MP, Chartier L, Bourlet T, et al. Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime Extraction-Quantification Systems for HIV-1 Subtypes. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2007;44(5):500-5 [10.1097/QAI.0b013e31803260df](https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31803260df).
60. Damond F, Avettand-Fenoel V, Collin G, Roquebert B, Plantier JC, Ganon A, et al. Evaluation of an Upgraded Version of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test for HIV-1 Load Quantification. *Journal of clinical microbiology*. 2010 April 1, 2010;48(4):1413-6.
61. Geretti AM, Tong W, Fox Z, Labbett W, O'shea O, Chrystie L, et al. The Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS®TaqMan® HIV-1 version 2.0 assay for HIV-1 RNA load

measurement in plasma shows improved detection of non-B subtypes and increased levels of detection and reporting. EACS 2009: HIV Medicine; 2009. p. 45-221(Suppl. 2).

62. de Mendoza C, Soriano V. Update on HIV viral-load assays: new technologies and testing in resource-limited settings. *Future Virology*. 2009;4(5):423-30.

63. Swanson P, Huang S, Abravaya K, de Mendoza C, Soriano V, Devare SG, et al. 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. *Journal of Virological Methods*. 2007;141(1):49-57.

64. Tang N, Huang S, Salituro J, Mak W-B, Cloherty G, Johanson J, et al. 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. *Journal of virological methods*. 2007;146(1):236-45.

65. Ruelle J, Jnaoui K, Lefèvre I, Lamarti N, Goubau P. Comparative evaluation of the VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR molecular system (kPCR) for the quantification of HIV-1 plasma viral load. *Journal of Clinical Virology*. 2009;44(4):297-301.

66. Stevens WS, Scott LM, Crowe SM. Quantifying HIV for monitoring antiretroviral therapy in resource-poor settings. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(Supplement 1):S16-S26.

67. Respass RA, Cachafeiro A, Withum D, Fiscus SA, Newman D, Branson B, et al. Evaluation of an ultrasensitive p24 antigen assay as a potential alternative to human immunodeficiency virus type 1 RNA viral load assay in resource-limited settings. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(1):506-8.

68. Greengrass VL, Plate MM, Steele PM, Denholm JT, Cherry CL, Morris LM, et al. Evaluation of the Cavid ExaVir Load assay (version 3) for plasma human immunodeficiency virus type 1 load monitoring. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(9):3011-3.

69. Stevens G, Rekhviashvili N, Scott L, 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. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(2):857-61.

70. Stewart P, Cachafeiro A, Napravnik S, Eron JJ, Frank I, van der Horst C, et al. Performance characteristics of the Cavid ExaVir viral load assay and the ultra-sensitive P24 assay relative to the Roche Monitor HIV-1 RNA assay. *Journal of Clinical Virology*. 2010;49(3):198-204.

71. Labbett W, Garcia-Diaz A, Fox Z, Clewley GS, Fernandez T, Johnson M, et al. Comparative Evaluation of the ExaVir Load Version 3 Reverse Transcriptase Assay for

- Measurement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Plasma Load. *Journal of clinical microbiology*. 2009 October 1, 2009;47(10):3266-70.
72. Fiscus SA, Cheng B, Crowe SM, Demeter L, Jennings C, Miller V, et al. HIV-1 Viral Load Assays for Resource-Limited Settings. *PLoS Med*. 2006;3(10):e417.
73. Puren A, Gerlach JL, Weigl BH, Kelso DM, Domingo GJ. Laboratory operations, specimen processing, and handling for viral load testing and surveillance. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(Supplement 1):S27-S36
74. Holodniy M. HIV-1 Load Quantitation: A 17-Year Perspective. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(Supplement 1):S38-S44.
75. Lee S, Wood O, Taffs RE, Hu J, Machuca A, Vallejo A, et al. Development and evaluation of HIV-1 subtype RNA panels for the standardization of HIV-1 NAT assays. *Journal of Virological Methods*. 2006;137(2):287-
76. Michael NL, Herman SA, Kwok S, Dreyer K, Wang J, Christopherson C, 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. *J Clin Microbiol*. 1999 August 1, 1999;37(8):2557-63.
77. Nolte FS, Boysza J, Thurmond C, Clark WS, Lennox JL. 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*. 1998 March 1, 1998;36(3):716-20.
78. Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, Fearnhill E, et al. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(9):1296-305.
79. Luft LM, Gill MJ, Church DL. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2011;15(10):e661-e70.
80. Crump JA, Scott LE, Msuya E, Morrissey AB, Kimaro EE, Shao JF, et al. Evaluation of the Abbott m2000rt RealTime™ HIV-1 assay with manual sample preparation compared with the ROCHE COBAS® AmpliPrep™/AMPLICOR™ HIV-1 MONITOR® v1.5 using specimens from East Africa. *Journal of Virological Methods*. 2009;162(1-2):218-22.
81. Lima V, Harrigan R, Montaner JS. Increased reporting of detectable plasma HIV-1 RNA levels at the critical threshold of 50 copies per milliliter with the Taqman assay in comparison to the Amplicor assay. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2009;51(1):3-6.

82. Cohen C. Low-Level Viremia in HIV-1 Infection: Consequences and Implications for Switching to a New Regimen. *HIV Clinical Trials*. 2009;10(2):116-24.
83. García-Gascó P, Maida I, Blanco F, Barreiro P, Martín-Carbonero L, Vispo E, et al. Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(3):699-704.
84. Reekie J, Mocroft A, Sambatakou H, Machala L, Chiesi A, Van Lunzen J, et al. Does less frequent routine monitoring of patients on a stable, fully suppressed cART regimen lead to an increased risk of treatment failure? *Aids*. 2008;22(17):2381-90.
85. Monitoring the response to ART and the diagnosis of treatment failure: New recommendations in Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. In: Organization HADWH, editor. Geneva -Switzerland2013.
86. Grennan JT, Loutfy MR, Su D, Harrigan PR, Cooper C, Klein M, et al. Magnitude of virologic blips is associated with a higher risk for virologic rebound in HIV-infected individuals: a recurrent events analysis. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(8):1230-8.
87. Widdrington J, Payne B, Medhi M, Valappil M, Schmid ML. The significance of very low-level viraemia detected by sensitive viral load assays in HIV infected patients on HAART. *Journal of Infection*. 2011;62(1):87-92
88. Harrigan R, Sherlock C, Hogg R, al e. What should be the primary virological endpoint in clinical trials of ARV efficacy? 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; Boston, USA.: Abstract 661; 2011.
89. Brumme CJ, Swenson LC, Wynhoven B, Yip B, Skinner S, Lima VD, et al. Technical and Regulatory Shortcomings of the TaqMan Version 1 HIV Viral Load Assay. *PloS one*. 2012;7(8):e43882.
90. Gianotti N, Galli L, Racca S, Salpietro S, Cossarini F, Spagnuolo V, et al. Residual viraemia does not influence 1 year virological rebound in HIV-infected patients with HIV RNA persistently below 50 copies/mL. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012 January 1, 2012;67(1):213-7.
91. Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L, Icard V, Saoudin H, Trabaud M-A, et al. HIV-1 Load Comparison Using Four Commercial Real-Time Assays. *J Clin Microbiol*. 2011 January 1, 2011;49(1):292-7.
92. O'Shea S, Chrystie I, Cranston R, Mullen J, Corbett K, Murphy G, et al. Problems in the interpretation of HIV-1 viral load assays using commercial reagents. *Journal of medical virology*. 2000;61(2):187-94

6.2 Artigo Científico

Manuscrito para submissão ao periódico Journal of Clinical Virology

A comparison of bDNA and TaqMan PCR assays in the detection of circulating HIV-1 virus

Daniela Ferreira Passos^a, Kavin Abelak^b, Sandra Leistner Segal^a, Adrian Wildfire^b

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brazil.

^b HIV/GUM Research Laboratory. Chelsea and Westminster Hospital. London, United Kingdom.

Key-words: HIV- quantification- viral load- PCR-bDNA

Abstract

HIV-1 RNA quantification is a valuable tool for monitoring the amount of circulating virus in HIV1-infected individuals. Plasma viral load measurements may act both as a marker for disease progression as well as a key indicator in treatment efficacy. Inaccurate viral RNA values may subsequently lead to inappropriate or sub-optimal antiretroviral treatment. There are several commercially available methods to quantify circulating virus. However, some studies comparing these technologies have evidenced discordant viral load values assessed by different assays. The performance of viral load assays remains important to clinicians if they are to effectively manage patients according to monitoring and treatment guidelines. In this study, two methods to quantify viral load are evaluated: one is based on real-time PCR and the other is based on branched-DNA technology. We found that Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 PCR systematically shows higher viral load results when compared to bDNA Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0. These results are very much likely to be due to the real-time PCR increased sensitivity.

Background

Predictive markers in the progression to AIDS have previously been identified in HIV-positive patients. A wide range of virological and immunological markers such as p24 antigen, syncytium-inducing phenotype and reduced in vitro T cell function may indicate that disease is progressing. However, it is commonly accepted that low CD4 counts and high viral load are the primary indicators that intervention may be required (1-3).

The first studies to consider associations between immunologic markers and disease progression in HIV demonstrated a statistically significant correlation between CD4 counts and clinical outcome (4-5). Viral load values were also noted to be prognostic, independent of CD4 counts (5-8). Observed increases in the circulating HIV virus are directly linked to decreases in absolute CD4 counts (6, 9-10). Increased viral replication within cells carrying the CD4 marker ultimately leads to destruction of the target cell with a corresponding reduction of immunocompetence (11-12).

Guidelines for the treatment of HIV (13) highlight the importance of viral load and CD4 counts as threshold indices in initiating ARV (Antiretroviral) therapy. The efficacy of the HAART (Highly Active Antiretroviral Treatment) can be evaluated through viral load quantification and absolute CD4 counts, independent of other markers (8, 14). However, viral load has proven to be a better predictive marker for disease progression, survival time and mortality than CD4 (7, 15).

This study compares two viral load quantification methods: the real-time PCR-based Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 (TaqMan) and branched-DNA Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 on the 440 system (bDNA). The two methodologies vary in a series of features. The bDNA methodology is based on signal amplification by a series of hybridization reactions rather than nucleic acid amplification as the TaqMan. bDNA targets the pol gene whilst TaqMan targets the gag and LTR. Another difference is the time of detection: bDNA has an endpoint approach to detection whereas TaqMan detection occurs as the amplification product accumulates during the amplification process (real-time). Group and subtype detection is also distinct: bDNA detects group M (subtypes A-G) and TaqMan group M (subtypes A-H) as well as group O. Ultimately, the dynamic range for bDNA is 50-500,000 and for TaqMan 40-10 million copies/mL.

Methods

1000 plasma samples received at the HIV/GUM Research Laboratory within Chelsea and Westminster Hospital for HIV-1 viral load quantification between December 2009 and January 2010 were tested by both Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 and Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 methods.

In the first part of the analysis, we stratified the viral load results into four groups: undetectable, 50-250 copies/mL, 251- 50000 copies/mL and above 50,001 copies/mL. We analysed the percentage in each stratum based on TaqMan and bDNA results. We also stratified the results in <500 and ≥ 500 copies/mL and in <1000 and ≥ 500 copies/mL. The kappa coefficient (16) was calculated to measure the agreement between the results obtained in both Taqman and bDNA methodologies.

In the second part of the analysis, we included only samples within the dynamic ranges of the two assays (50-500.000 copies/mL), excluding all the undetectable samples by either method. The log differences and the log mean difference were calculated and plotted against the endpoint of $0.5\log_{10}$. The correlation coefficient (r) was utilised to measure the strength of the correlation between the two methods. Bland and Altman statistical test (17) was employed as a measure of agreement to determine the magnitude of concordance between the two methods considering the expected differences, as well as to detect the presence of a tendency and unusual values.

Results

We found 975 samples valid for analysis, 2 were excluded for being above the detection limit and 23 were removed due to failure in either methodology, resulting in non-comparable results.

A total of 640 samples were undetectable by both methods, 133 were undetectable by either method and 202 were detectable by both methods. Stratified TaqMan and bDNA results are shown in Table 1. A total of 778 samples (79.79%) had results within the same stratum, from which 640 samples undetectable by both methodologies representing the higher percentage of agreement. Extremely discrepant results, in which one result was >49 cps/mL

in one assay and <50.001 in the other assay, occurred in only 5 samples (0.51%), The kappa coefficient for the values as they are in Table 1 was 0.548 ($p<0.001$).

Undetectable results by bDNA were detectable by TaqMan in 109 samples (11.18%): 79 (50 and 250 copies/mL), 27 (251 and 50000 copies/mL) and 3 (<50.001). Only 24 samples were detectable by bDNA and undetectable by TaqMan. These results show systematic overquantification by TaqMan when compared to bDNA, particularly in the lower strata.

We had particular interest in the cut-off points of 500 and 1000 copies/mL since they are important to define virological failure and define the threshold for successful analysis of complementary monitoring tests. The analysis of this cut-off points are shown in Table 2 and Table 3. When the 500 copies/mL cut-off point was analysed, 918 samples (94.5%) were within the same stratum with a kappa coefficient of 0.802, showing substantial agreement (16). Even better correlation was demonstrated on the 1000 copies/mL cut-off point investigation where 927 samples (95.07%) were in the same stratum and the kappa coefficient was 0.815. An overquantification by TaqMan can be noted as the discrepant results are analysed: 49 samples (5.6%) and 43 samples (4.41%) were on the higher strata by TaqMan and on the lower strata by bDNA on the 500 and 1000 copies/mL cut-off points respectively.

Excluding undetectable samples by either methodology, the remaining 202 samples were analysed. The correlation coefficient (r) was 0.942 ($p<0.001$).

A total of 87 samples (43.07%) detectable by both methods had log differences greater than $0.5\log_{10}$. The mean log difference for the detectable samples was $0.5233 (\pm 0.34578, p=0.339)$. The Bland Altman plot (Figure 2) shows the mean log differences plotted against the mean log difference (0.5233).

Figure 1. Scatterplot showing the linear correlation between the Taqman and bDNA viral load results transformed to logarithm with base 10.

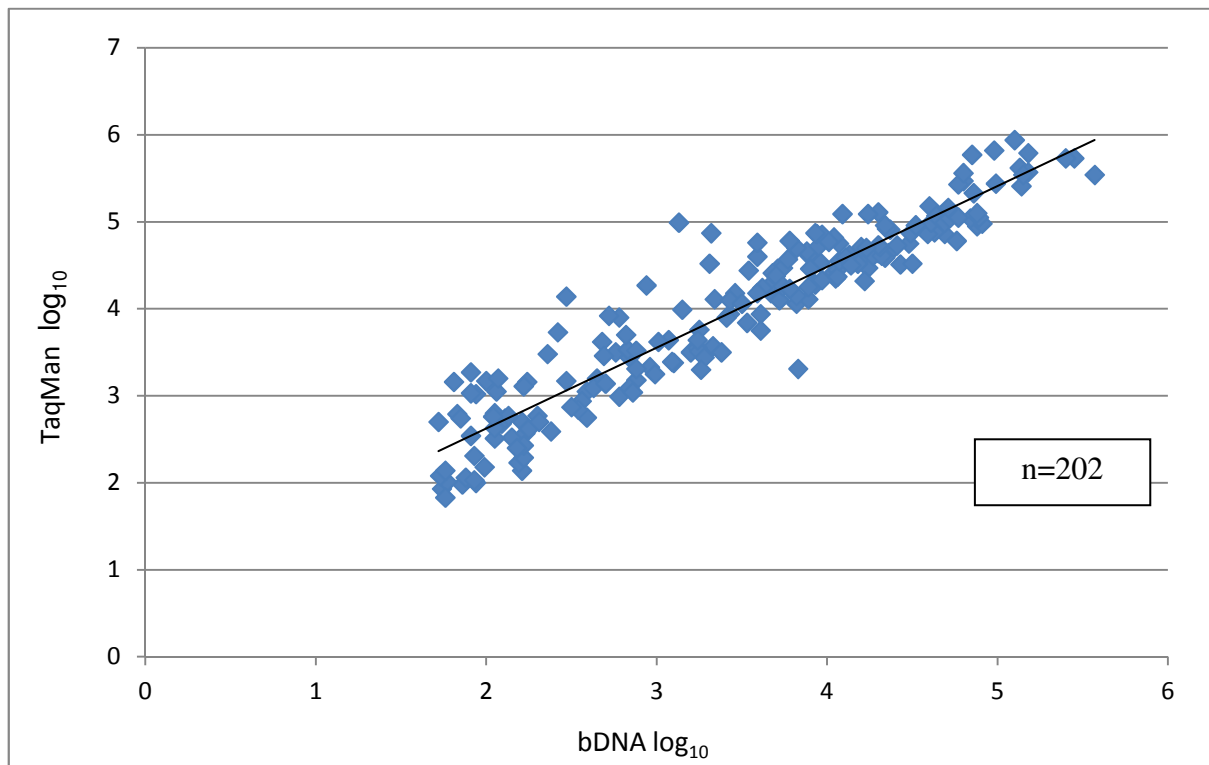
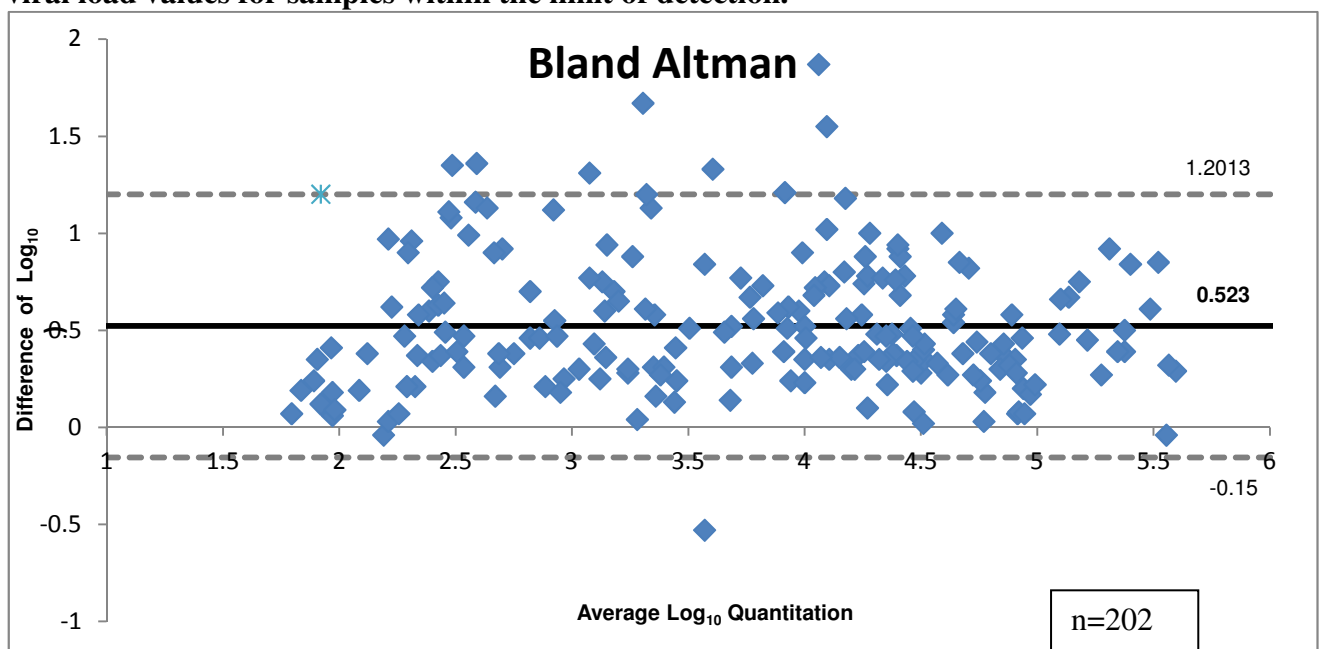


Figure 2. Bland-Altman scatterplot of differences in viral load values versus average viral load values for samples within the limit of detection.



Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluates the correlation between TaqMan v2.0 and bDNA v3.0. Previous studies have showed the correlation between bDNA and Amplicor Monitor v1.5 (18, 19-22) and TaqMan v1.0 (23-26). TaqMan v1.0 has also been compared to Amplicor Monitor v1.5 (27-29) and TaqMan v1.0 (27-28, 30-32) as well as other real-time PCR methodologies (27, 29, 33-34).

Studies comparing bDNA to Amplicor v1.5 found a strong correlation between them (18, 20, 22). However, one study has found that results given by bDNA 3.0 were more reliable discriminating viral suppression from low-level viraemia, than the ones given by Amplicor 1.5. (21). When compared to Taqman v1.0, the quantification of non-B subtypes and recombinants was more consistent by TaqMan (15, 23), although a good correlation and agreement have been demonstrated between them (24, 26). Real-time PCR assays have been shown to correlate well with endpoint PCR. However, overquantification has been reported on the lower-end viral load values (26) due to a greater sensitivity observed in these methodologies (35). The newest version of TaqMan (v2.0) has been compared to its previous version and an improvement in detection has been revealed with regards to underestimation by v 1.0 when compared to Amplicor 1.5 (28, 31-32). The overall agreement between Taqman and bDNA was moderate. This outcome might be due the observed systematic overquantification by TaqMan when compared to bDNA, particularly in the lower strata. This has been shown by other studies when TaqMan 2.0 was compared to endpoint PCR (36, 37) and it is a probable consequence of a higher sensitivity in the TaqMan assay. Overquantification may cause difficulties when interpreting viral load results especially with regards to viral loads results below 250 copies/mL.

Overquantification by Taqman over bDNA must not be interpreted as a negative feature since it is an indicative of the increased sensitivity of this assay. In the lack of a gold standard, newer assays are compared to conventional ones, in this case bDNA. Increased sensitivity is a desirable feature, however for this the clinical significance of low-level must be reviewed. The current definitions of therapeutic failure, blips or rebound are determined using older less sensitive quantification techniques thus the confusion when a more sensitive assays are applied. Further clinical studies using the real-time PCR are necessary to determine whether novel cut-off points need to be established. The guidelines will also have to be updated as more laboratories will switch to real-time PCR quantification techniques.

Taking all this comparative information on board, greater viral load results by TaqMan v 2.0 over bDNA results were expected, particularly on the lower-end values. Our results showed a higher percentage of overquantification on the 50-250 copies/mL interval (8.10%), which was also expected when previous findings were considered (38). Nevertheless, we have not found significant discrepancies on our analysis of the 500 and 1000 copies/mL endpoints with strong (94.5%) and almost perfect (95.05%) agreement between the two methods. Our results indicate that detectable-but-low (50-250) copies/mL by TaqMan v2.0 are associated to undetectable values by bDNA and may not indicate virological failure. However, only clinical studies involving Taqmanv2.0 and clinical data could determine the correlation between these low-but-detectable results with virological failure. We also concluded that both methods agree on the quantification of viral loads around the virological failure endpoints.

Our results demonstrated that TaqMan not only detected viral loads undetectable by bDNA but also overquantified by average 0.52 log₁₀ samples within the dynamic range (50-500000 copies/mL). This difference is significant from the accepted 0.5 log₁₀ difference between two methods. This overquantification is likely to be attributed to the higher sensitivity of this methodology and the capacity of quantifying a wider range of subtypes.

The limitation of our study is the absence of subtype information available for these samples. A large cohort performed in the UK including Chelsea & Westminster patients have found that 73% of the UK HIV-infected patients were infected with subtype B (27); thus, we expect that the samples we analysed are mostly subtype B. However, we cannot affirm that the discrepant results were not related to the underquantification of non-B subtypes by bDNA.

A pattern could not be established for the outliers. The discrepant results, especially the very discrepant results might be either by lack of detection of a determined subtype or by pre-analytical errors.

The diversity of quantification methodologies commercially available apparently would facilitate the monitoring of these patients. However, the variability among these methodologies increases the complexity of result interpretation. Despite the efforts to compare and correlate these assays, there is no conversion factor to be applied to facilitate interpretation. Previous comparative studies have highlighted the importance of using a single

methodology when monitoring a patient (39-41), particularly when evaluating baseline and early follow up after initiation of treatment. Nevertheless, it may be not possible due several reasons including update to new technologies.

Even though statistically high levels of correlation and agreement may be established between some of them, individual results might not reflect this correlation leading to misinterpretation as it is the case of my samples analysed on this work. We recommend caution when comparing results from different methodologies in the clinic, especially when a conventional assay and a real-time PCR assay are concerned.

Our results allow us to infer that Taqman is not only a less labour intensive assay but also a more sensitive one. Further methodological comparative studies are needed to confirm such conclusion. The significance of such higher sensitivity for the monitoring of HIV-positive patients also requires additional investigation.

Table 1: TaqMan and bDNA results according to different strata.

TaqMan results	bDNA results (copies/mL)				Total
	>49	50 a 250	251 a 50.000	<50.001	
>49	640 (65.64%)	15 (1.54%)	7 (0.72%)	2 (0.21%)	664
50 a 250	79 (8.10%)	14 (1.44%)	0 (0%)	0 (0%)	93
251 a 50.000	27 (2.77%)	30 (3.08 %)	97(9.95%)	0 (0%)	154
<50.001	3(0.31%)	0 (0%)	34(3.49%)	27 (2.77%)	64
Total	749	59	138	29	975

Table 2. Taqman and bDNA results according to 500 copies/mL cut-off point.

TaqMan results	bDNA results		Total
	<500	>=500	
<500	772 (79.18%)	8 (0.82%)	780
>=500	49 (5.03%)	146 (14.97%)	195
Total	821	154	975

Table 3. Taqman and bDNA results according to 1000 copies/mL cut-off point.

TaqMan results	bDNA		
	results		
	<1000	>=1000	Total
<1000	797 (81.74%)	5 (0.51%)	802
>=1000	43 (4.41%)	130 (13.33%)	173
Total	840	135	975

References

1. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD. Changes in Plasma HIV RNA Levels and CD4+ Lymphocyte Counts Predict Both Response to Antiretroviral Therapy and Therapeutic Failure. *Annals of Internal Medicine*. 1997 June 15, 1997;126(12):939-45.
2. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, et al. Plasma Viral Load and CD4+ Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection. *Annals of internal medicine*. 1997;126(12):946-54.
3. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. *Annals of internal medicine*. 1997;126(12):929-38.
4. de Wolf F, Lange JMA, Houweling JTM, A.Coutinbo R, T.Scbellekens P, Noordaa Jvd, et al. Numbers of CD4+ Cells and the Levels of Core Antigens of and Antibodies to the Human Immunodeficiency Virus as Predictors of AIDS Among Seropositive Homosexual Men. *Journal of Infectious Diseases*. 1988 September 1, 1988;158(3):615-22.
5. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, et al. Changes in Plasma HIV-1 RNA and CD4+ Lymphocyte Counts and the Risk of Progression to AIDS. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(7):426-31.
6. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Annals of Internal Medicine*. 1995 April 15, 1995;122(8):573-9.

7. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science*. 1996 May 24, 1996;272(5265):1167-70.
8. Ghani AC, de Wolf F, Ferguson NM, Donnelly CA, Coutinho R, Miedema F, et al. Surrogate Markers for Disease Progression in Treated HIV Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2001;28(3):226-31.
9. Collaboration TATAC. Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: analysis of prospective studies. *Lancet*. 2003;362:679–86.
10. Egger M, May M, Chêne G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *The Lancet*. 2002 13 July 2002;360(9327):119-29.
11. Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JCC, Wijnholds F-J, de Vos NM, Nottet HSLM, et al. Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1998 November 1, 1998;178(5):1279-87.
12. Arnaout RA, Lloyd AL, O'Brien TR, Goedert JJ, Leonard JM, Nowak MA. A simple relationship between viral load and survival time in HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999 September 28, 1999;96(20):11549-53.
13. Asboe D, Aitken C, Boffito M, Booth C, Cane P, Fakoya A, et al. British HIV Association guidelines for the routine investigation and monitoring of adult HIV-1-infected individuals 2011. *HIV Medicine*. 2012;13(1):1-44.
14. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, et al. Monitoring Plasma HIV-1 RNA Levels in Addition to CD4+ Lymphocyte Count Improves Assessment of Antiretroviral Therapeutic Response. *Annals of Internal Medicine*. 1997 June 15, 1997;126(12):929-38.
15. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for Determination of HIV-1 Viral Loads in a Cohort of Canadian Patients with Diverse HIV Subtype Infections. *J Clin Microbiol*. 2011 January 1, 2011;49(1):118-24.
16. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37(5):360-3.
17. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet*. 1986;327(8476):307-10.
18. 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. *Journal of Clinical Virology*. 2005;34(4):245-52.

19. Lubelchek RJ, Max B, Sandusky CJ, Hota B, Barker DE. Reliability at the Lower Limits of HIV-1 RNA Quantification in Clinical Samples: A Comparison of RT-PCR versus bDNA Assays. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e6008.
20. Antunes R, Figueiredo S, Bártolo I, Pinheiro M, Rosado L, Soares I, et al. Evaluation of the Clinical Sensitivities of Three Viral Load Assays with Plasma Samples from a Pediatric Population Predominantly Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype G and BG Recombinant Forms. *Journal of clinical microbiology*. 2003 July 1, 2003;41(7):3361-7.
21. Elbeik T, Alvord GW, Trichavaroj R, de Souza M, Dewar R, Brown A, et al. Comparative analysis of HIV-1 viral load assays on subtype quantification: Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 versus Roche Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2002;29(4):330-9.
22. Anastassopoulou CG, Touloumi G, Katsoulidou A, Hatzitheodorou H, Pappa M, Paraskevis D, et al. Comparative evaluation of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 and 3.0 (bDNA) assays and the AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1. 5 test for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of virological methods*. 2001;91(1):67-74.
23. Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V. Performance of Three Commercial Viral Load Assays, Versant Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, Testing HIV-1 Non-B Subtypes and Recombinant Variants. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 September 2008;46(9):2918-23.
24. Katsoulidou A, Petrodaskalaki M, Sypsa V, Papachristou E, Anastassopoulou CG, Gargalianos P, et al. 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. *Journal of virological methods*. 2006;131(2):168-74.
25. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1. 0, Easy Q v1. 2, and Versant v3. 0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(1):118-24.
26. Pyne MT, Brown KL, Hillyard DR. Evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test and Identification of Rare Polymorphisms Potentially Affecting Assay Performance. *J Clin Microbiol*. 2010 August 1, 2010;48(8):2852-8.
27. Do T, Duncan J, Butcher A, Liegler T. Comparative frequencies of HIV low-level viremia between real-time viral load assays at clinically relevant thresholds. *Journal of Clinical Virology*. 2011;52:S83-S9.

28. Pas S, Rossen JW, Schoener D, Thamke D, Pettersson A, Babel R, et al. Performance evaluation of the new Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(4):1195-200.
29. Glaubitz J, Sizmann D, Simon CO, Hoffmann KS, Drogan D, Hesse M, et al. Accuracy to 2nd International HIV-1 RNA WHO Standard: Assessment of three generations of quantitative HIV-1 RNA nucleic acid amplification tests. *Journal of Clinical Virology*. 2011;50(2):119-24.
30. Damond F, Avettand-Fenoel V, Collin G, Roquebert B, Plantier JC, Ganon A, et al. Evaluation of an Upgraded Version of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test for HIV-1 Load Quantification. *Journal of clinical microbiology*. 2010 April 1, 2010;48(4):1413-6.
31. Wirden M, Tubiana R, Fourati S, Thevenin M, Simon A, Canestri A, et al. Upgraded Cobas Ampliprep-Cobas TaqMan Version 2.0 HIV-1 RNA Quantification Assay versus First Version: Correction of Underestimations. *Journal of clinical microbiology*. 2011 July 1, 2011;49(7):2700-2.
32. Geretti AM, Tong W, Fox Z, Labbett W, O'shea O, Chrystie L, et al. The Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS®TaqMan® HIV-1 version 2.0 assay for HIV-1 RNA load measurement in plasma shows improved detection of non-B subtypes and increased levels of detection and reporting. *EACS 2009: HIV Medicine; 2009*. p. 45-221(Suppl. 2).
33. Wojewoda CM, Spahlinger T, Harmon ML, Schnellinger B, Li Q, DeJelo C, et al. Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 (CAP/CTM v2. 0) with other real-time PCR assays in HIV-1 monitoring and follow-up of low-level viral loads. *Journal of virological methods*. 2012.
34. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2. 0 in HIV-1 positive patients with low viral load: a comparative study. *Journal of virological methods*. 2011;173(2):399-402.
35. Oliver AR, Pereira SF, Clark DA. Comparative evaluation of the automated Roche TaqMan real-time quantitative human immunodeficiency virus type 1 RNA PCR assay and the Roche AMPLICOR Version 1.5 conventional PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(11):3616-9.
36. Yan CS, Hanafi I, Kelleher AD, Carr AD, Amin J, McNally LP, et al. Lack of correlation between three commercial platforms for the evaluation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load at the clinically critical lower limit of quantification. *Journal of Clinical Virology*. 2010;49(4):249-53.
37. Garrett NJ, Apea V, Nori A, Ushiro-Lumb I, Oliver AR, Bailly G, et al. Comparison of the rate and size of HIV-1 viral load blips with Roche COBAS TaqMan HIV-1 versions 1.0

and 2.0 and implications for patient management. *Journal of Clinical Virology*. 2012;53(4):354-5.

38. Brumme CJ, Swenson LC, Wynhoven B, Yip B, Skinner S, Lima VD, et al. Technical and Regulatory Shortcomings of the TaqMan Version 1 HIV Viral Load Assay. *PloS one*. 2012;7(8):e43882

39. Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V. Performance of Three Commercial Viral Load Assays, Versant Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, Testing HIV-1 Non-B Subtypes and Recombinant Variants. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 September 2008;46(9):2918-23.

40. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2. 0 in HIV-1 positive patients with low viral load: a comparative study. *Journal of virological methods*. 2011;173(2):399-402.

41. Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L, Icard V, Saoudin H, Traubad M-A, et al. HIV-1 Load Comparison Using Four Commercial Real-Time Assays. *J Clin Microbiol*. 2011 January 1, 2011;49(1):292-7.

7 Considerações Finais

Embora não haja dados na literatura sobre a correlação e concordância entre as técnicas de TaqMan PCR e bDNA nas versões comparadas neste estudo (Cobas AmpliPrep TaqMan HIV-1 v2.0 e branched-DNA Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 utilizando o sistema 440), os resultados obtidos foram compatíveis com os esperados. Os nossos resultados indicaram superquantificação pelo TaqMan em relação ao bDNA e uma correlação linear forte entre as duas técnicas. Estudos anteriores compararam ambas versões utilizadas com o Amplicor 1.5, que foi considerado o padrão-ouro antes de sair fora do mercado sendo substituído por técnicas de PCR em tempo real (TaqMan). A correlação entre bDNA e Amplicor 1.5 foi considerada forte, embora discordância nos valores baixos de carga viral tenha sido descrita. Quando o TaqMan v 2.0 foi comparado ao Amplicor 1.5, superquantificação também foi demonstrada, desta vez pelo Taqman 2.0.

A significância clínica da viremia em níveis baixos ainda não foi completamente definida, portanto o impacto destes resultados obtidos por diferentes técnicas precisa ser definido. Embora blips ou rebote viral entre 40 e 500 cópias/mL possam não evoluir para falha virológica, quando persistentes eles devem ser investigados com avaliação da aderência e outros testes para avaliar o desenvolvimento de resistência aos antiretrovirais. Variações observadas entre técnicas, especialmente quando uma técnica mais sensível é aplicada, podem gerar ansiedade e custos desnecessários.

Quando ocorreu a mudança de metodologia de bDNA para TaqMan 2.0 no monitoramento dos pacientes acompanhados no Chelsea & Westminster Hospital, o maior problema observado foi que pacientes que estavam em acompanhamento por bDNA que tinham atingido a supressão viral, agora mostravam cargas virais detectáveis. A superquantificação pelo PCR já havia sido descrita na literatura, mesmo assim teve um o impacto nos médicos, pacientes e no relatório de blips. A verdade é que não se sabia o quanto esta diferença era aceitável ou o quanto isto se devia à troca de metodologias ou a uma falha terapêutica real. Este estudo surgiu da necessidade de estabelecer esta correlação e avaliar a magnitude da concordância entre estas duas técnicas.

Como o bDNA e o PCR são as técnicas mais utilizadas no Reino Unido e também largamente utilizadas em outros países, outros estudos sobre a concordância entre TaqMan v

2.0 e bDNA precisam ser realizados no futuro, talvez com um número maior de amostras detectáveis acompanhadas da genotipagem para a determinação dos grupos e subtipos do HIV-1.

8 Anexos

Anexo1. Lista de antiretrovirais aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos.

Classe	Nome	Nome Genérico	Data de aprovação pelo FDA
Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos	Combivir	lamivudine and zidovudine	27-Sep-97
	Emtriva	emtricitabine, FTC	02-Jul-03
	Epivir	lamivudine, 3TC	17-Nov-95
	Epzicom	abacavir and lamivudine	02-Aug-04
	Hivid	zalcitabine, dideoxycytidine, ddC	19-Jun-92
	Retrovir	zidovudine, azidothymidine, AZT, ZDV	19-Mar-87
	Trizivir	abacavir, zidovudine, and lamivudine	14-Nov-00
	Truvada	tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine	02-Aug-04
	Videx EC	enteric coated didanosine, ddI EC	31-Oct-00
	Videx	didanosine, dideoxyinosine, ddI	9-Oct-91
	Viread	tenofovir disoproxil fumarate, TDF	26-Oct-01
	Zerit	stavudine, d4T	24-Jun-94
Ziagen	abacavir sulfate, ABC	17-Dec-98	
Inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo	Edurant	rilpivirine	20-May-11
	Intelence	etravirine	18-Jan-08
	Rescriptor	delavirdine, DLV	4-Apr-97
	Sustiva	efavirenz, EFV	17-Sep-98
	Viramune	nevirapine, NVP	21-Jun-96
	Viramune XR	nevirapine, NVP	25-Mar-11
	Agenerase	amprenavir, APV (no longer marketed)	15-Apr-99
	Aptivus	tipranavir, TPV	22-Jun-05
	Crixivan	indinavir, IDV,	13-Mar-96
	Fortovase	saquinavir	7-Nov-97
	Invirase	saquinavir mesylate, SQV	6-Dec-95
	Kaletra	lopinavir and ritonavir, LPV/RTV	15-Sep-00

Inibidores da protease	Lexiva	Fosamprenavir Calcium, FOS-APV	20-Oct-03
	Norvir	ritonavir, RTV	1-Mar-96
	Prezista	darunavir	23-Jun-06
	Reyataz	atazanavir sulfate, ATV	20-Jun-03
	Viracept	nelfinavir mesylate, NFV	14-Mar-97
Inibidores de entrada - inibidores de fusão	Fuzeon	enfuvirtide, T-20	13-Mar-03
Inibidores de entrada - antagonistas de co-receptores	Selzentry	maraviroc	06-August-07
Inibidores da integrase	Isentress	raltegravir	12--Oct-07
	Tivicay	dolutegravir	13-August-13
Combinações multi-classe	Atripla	efavirenz, emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate	12-July-06
	Complera	emtricitabine, rilpivirine, and tenofovir disoproxil fumarate	10-August-11
	Stribild	elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate	27-August-12