

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



**Desenvolvimento de uma técnica de PCR
em Tempo Real para deteção do Vírus da
Imunodeficiência Humana Tipo 1**

Vanessa Sofia Gomes Almeida

Dissertação
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente
2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Desenvolvimento de uma técnica de PCR em Tempo Real para deteção do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1

Vanessa Sofia Gomes Almeida

Dissertação para obtenção do grau de Mestre orientada por Doutora Elizabeth Pádua, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Professora Doutora Ana Crespo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente
2012**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho:

À Doutora Elizabeth Pádua, por desenvolver e orientar este estudo, pelos conhecimentos transmitidos e, principalmente, pelo apoio e dedicação demonstrados ao longo deste ano.

À Professora Doutora Ana Crespo, por ter aceitado coorientar este trabalho e pela disponibilidade demonstrada.

À Ivone Água-Doce e à Catarina Almeida, um especial agradecimento pelo tempo despendido para o ensinamento de técnicas e protocolos do laboratório, pelo apoio e companhia durante todo o tempo que durou o trabalho prático.

Ao Doutor Baltazar Nunes, pelos ensinamentos prestados para que fosse possível desenvolver uma análise estatística do trabalho.

A todos do Instituto que de alguma forma contribuíram e influenciaram o trabalho.

À Cristina pela companhia nos momentos de lazer e nas horas de almoço.

À Ana Patrícia, à Maria Rodrigues e à Maria Santos, pela amizade e carinho.

À Cláudia Onofre pelo apoio, preocupação e atenção demonstradas mas sobretudo pela amizade que se solidificou ao longo deste ano.

À Daniela Salvador, que mesmo longe me apoiou, ouviu e aconselhou durante todo o trabalho. Pela amizade e carinho, e pelas longas conversas através do computador.

À Vera Santos, pela companhia diária, tanto no instituto como em casa, sem ela nada teria sido igual, pelo apoio e paciência demonstradas, pela grande amizade, carinho e amor.

Aos meus pais, pelo amor e apoio que me deram durante toda a minha vida, que sempre impulsionaram os meus estudos, confiaram nas minhas capacidades e que nunca duvidaram das minhas escolhas.

Resumo

As crianças verticalmente infetadas por VIH-1 têm elevado risco de progressão para SIDA nos primeiros anos de vida. Por um lado, este facto evidencia a importância do diagnóstico precoce da infeção permitindo tratamento atempado, e por outro lado, fundamenta ainda a procura constante da melhoria dos ensaios experimentais de diagnóstico.

A técnica de *nested* PCR implementada no laboratório para diagnóstico precoce é sensível e específica, mas obriga a uma manipulação de produtos amplificados com maior risco da ocorrência de contaminações. É também considerado um método moroso já que associa a duas reações de amplificação sequenciais uma eletroforese em gel de agarose para deteção dos produtos amplificados.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um ensaio experimental sensível e específico, alternativo à técnica de *nested* PCR, que pudesse conduzir à obtenção de ganhos no tempo de saída de resultados e na redução do risco de ocorrência de contaminações.

Diferentes ensaios experimentais de PCR em Tempo Real foram desenvolvidos para a amplificação de fragmentos do VIH-1 (região LTR e *pol*) e efetuada uma avaliação prévia de resultados com a utilização de 3 grupos de amostras de referência: amostras positivas (n=15), amostras com ADN VIH-1 quantificado (n=8) e amostras negativas (n=11, positivas para VIH-2). Nos ensaios, foram diretamente testadas amostras de ADN viral extraído de CMSP ou sintetizado a partir de plasma, e também, amostras correspondentes a produtos de PCR gerados por uma prévia amplificação do ADN através de PCR Convencional. Foi selecionado o algoritmo experimental que revelou melhor desempenho na deteção da infeção VIH-1 para análise de amostras clínicas. Estas amostras foram obtidas entre 2009 e 2011, e correspondem a amostras colhidas a mães infetadas (positivas VIH-1, n=149) e a filhos em que não ocorreu a transmissão do vírus (amostras negativas, n=20).

O algoritmo experimental em Tempo Real escolhido correspondeu à amplificação de fragmentos de VIH-1 (região LTR) utilizando a combinação dos *primers* HL456N e HL602C com a sonda TaqMan SHL478N, a partir de amostras de ADN previamente submetidas a PCR Convencional com os *primers* externos HL456N e HL650C. Em resultado da prévia avaliação com amostras de referência, este algoritmo revelou sensibilidade de 86,7% e um limite de deteção ADN VIH-1 de 0,8 cópias/amostra. Com amostras clínicas foi obtida uma sensibilidade de 75,2 % e de especificidade de 100%. A confirmação da infeção com primeiras e segundas amostras foi conseguida em 87,5% dos casos (112 casos positivos entre 128 estudados). Foi também obtido um valor de Kappa de 0,417 que mostrou uma concordância moderada entre resultados esperados e obtidos. Comparativamente, na técnica de *nested* PCR eram conhecidos valores de sensibilidade e especificidade respetivamente de 81,9% e 100% e uma concordância estimada pelo valor de Kappa de 0,565. A confirmação dos casos de infeção com primeiras e segundas amostras foi conseguida em 95,3% dos casos (122 casos positivos entre 128 estudados).

Embora se tenha conseguido informação útil e obtido ganhos em tempo através do algoritmo experimental desenvolvido, este apresenta sensibilidade inferior à técnica de *nested* PCR utilizada no laboratório. Deste modo, para além do aumento da população/amostras em estudo, que se concluiu ser necessário para melhor tratamento estatístico dos resultados, será

também essencial um incremento da sensibilidade dos ensaios que poderá ser obtido explorando outras regiões genómicas alvo alternativas às utilizadas no presente estudo.

Palavras-chave: VIH-1; PCR em Tempo Real; LTR e *pol*; sensibilidade e especificidade

Abstract

Vertically HIV-1 infected children have increased risk of progression to AIDS in the early years of life. On one hand, this highlights the importance of early detection of infection enabling prompt treatment, and moreover, underlies the constant search for improved experimental tests for diagnosis.

The nested PCR technique implemented in the laboratory for early diagnosis of HIV infection is sensitive and specific but requires handling of amplified products with a higher risk of contamination. It is also considered a time consuming method that combines two sequential amplification reactions and agarose gel electrophoresis for detection of amplified products.

The aim of this study was to develop a sensitive and specific assay, alternative to nested PCR technique, which could lead to gains in response time and reducing the risks of contamination.

Different experimental assays of Real Time PCR were developed for amplification of fragments of HIV-1 (LTR and *pol* region) and a preliminary evaluation of results was performed with the use of three groups of reference samples: positive samples (n= 15), quantified DNA HIV-1 samples (n= 8) and negative samples (n= 11, positive for HIV-2). In the assays were directly tested samples of viral DNA, extracted from PBMC or synthesized from plasma, and also samples corresponding to PCR products generated by a previous amplification of the DNA by Conventional PCR. The experimental algorithm that showed better performance in the detection of HIV-1 infection was selected to analyze the clinical samples which were obtained between 2009 and 2011, and correspond to samples collected from the infected mothers (HIV-1 positive, n= 149) and children to whom no virus transmission occurred (negative, n= 20).

The chosen experimental algorithm for Real Time amplification corresponded to fragments of HIV-1 (LTR region) using the combination of primers HL456N, HL602C and SHL478N TaqMan probe, from DNA samples previously subjected to conventional PCR with the external primers HL456N and HL650C. As a result of preliminary evaluation, this algorithm has shown a sensitivity of 86.7% and a detection limit of 0.8 copies for sample. In clinical samples was obtained a sensitivity of 75.2% and specificity of 100%. Confirmation of infection with first and second samples was achieved in 87.5% of cases (112 positive cases among 128 studied). It has also obtained a Kappa value of 0.417 which showed a moderate agreement between expected and obtained results. Comparatively, for the nested PCR technique were known sensitivity and specificity of 81.9% and 100% respectively and a concordance estimated by Kappa value of 0.565. The confirmation of infection cases with first and second samples was achieved in 95.3% of cases (122 cases between 128 positives).

Although this study has achieved useful information and gains in time through the algorithm developed, this shows lower sensitivity than the nested PCR technique already used in the laboratory. Thus, in addition to the increase in population/samples to be analyzed for improved statistical treatment of the results, is also essential an increment in the sensitivity of assays which can be obtained by exploring other genomic regions alternatives to the target used in this study.

Keywords: HIV-1; Real Time PCR; LTR e *pol*; sensibility and specificity

Índice Geral

	Páginas
Agradecimentos	i
Resumo	ii
<i>Abstract</i>	iv
Índice Geral	v
Lista de Abreviaturas	vii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
1. Introdução	1
1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)	2
1.1.1 Morfologia e Organização Genómica	2
1.1.2 Ciclo Replicativo	3
1.1.3 Imunopatogénese	4
1.1.4 Vias da Transmissão	5
1.1.5 Terapêutica anti-retrovírica	6
1.2 Prevalência e Epidemiologia Molecular da Infecção VIH-1	6
1.3 Métodos Moleculares de Diagnóstico da Infecção VIH-1	8
1.3.1 Reação de Amplificação por PCR Convencional	8
1.3.2 Reação de Amplificação por PCR em Tempo Real	9
1.3.3 Vantagens e Desvantagens	11
2. Objetivos	14
3. Material e Métodos	16
3.1 Diagrama Geral do Estudo	17
3.2 <i>Primers</i> e Sondas	18
3.3 Ensaio Experimentais Desenvolvidos	19
3.4 Amostras de Referência	22
3.4.1 Amostras de ADN incluídas em Programa de Controlo de Qualidade	22
3.4.2 Amostras ADN VIH-1 Positivas	22
3.4.3 Amostras de ADN VIH-2 Positivas	23
3.5 Amostras Clínicas	23
3.5.1 Amostras de Mães Infetadas por VIH-1	23
3.5.2 Amostras de Filhos Nascidos de Mães Infetadas por VIH-1	24
3.6 Preparação das Amostras	24
3.6.1 Separação de CMSP e Extração e Purificação do ADN	24
3.6.2 Extração de ARN a partir do Plasma	25
3.6.3 Síntese de ADN Complementar	25
3.7 Reação de Amplificação de Ácidos Nucleicos	25
3.7.1 Reação de PCR Convencional	25
3.7.2 Reação de PCR em Tempo Real	26
3.8 Análise Estatística	27
4. Resultados	28

4.1 Avaliação dos Resultados Obtidos nos Ensaios com Amostras de Referência	29
4.2 Avaliação dos Resultados Obtidos no Algoritmo com Amostras Clínicas	38
5. Discussão	40
6. Conclusão	47
7. Bibliografia	49

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico
ADNc – ADN complementar
ARN - Ácido Ribonucleico
ARNm – ARN mensageiro
AZT – Zidovudina
CA – Proteína da cápside ou p24
CMSP – Células Mononucleadas do Sangue Periférico
CRF – *Circulating Recombinant Forms*
Ct – Ciclo *threshold*
dNTP – Desoxirribonucleótidos fosfatados
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
Env – Proteínas do invólucro
FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
Gag – *group-specific antigen*
HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*
ICTV – Comité Internacional para a Classificação Taxonómica dos Vírus
IN – Integrase
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
LTR – *Long Terminal Repeats*
M – Major
MA – Proteína matriz ou p17
N – non-M/non-O
NC – Proteína da nucleocápside ou p7
O – Outlier
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
Pol – Polimerase
PR – Protease
QCMD – Quality Control for Molecular Diagnosis
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia
SPSS – Statistical Package for Social Studies
SU – Glicoproteínas de superfície ou gp120
TAR – Terapêutica anti-retrovírica
TM – Glicoproteínas transmembranares ou gp41
TR – Transcriptase Reversa
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Índice de Figuras

	Páginas
1. Introdução	
Figura 1.1 – Representação esquemática da partícula VIH.	3
Figura 1.2 – Organização dos genes e principais proteínas do genoma do VIH.	3
Figura 1.3 – Representação gráfica do processo de reação de PCR em Tempo Real.	10
Figura 1.4 – Esquema de atividade das sondas TaqMan marcadas com FAM e TAMRA.	12
3. Material e Métodos	
Figura 3.1 – Diagrama de trabalho baseado nos ensaios experimentais desenvolvidos no presente estudo com a utilização de amostras de referência.	17
Figura 3.2 – Algoritmo experimental selecionado no presente estudo para o ensaio de amostras clínicas.	18
Figura 3.3 – Representação esquemática da localização e direção dos <i>primers</i> e sondas, bem como o tamanho dos fragmentos esperados, para a região LTR do VIH-1 (Ensaio experimental A).	21
Figura 3.4 – Representação esquemática da localização e direção dos <i>primers</i> e sondas, bem como o tamanho dos fragmentos esperados, para a região <i>pol</i> do VIH-1 (Ensaios experimentais B, C e D).	21

Índice de Tabelas

	Páginas
3. Material e Métodos	
Tabela 3.1 – <i>Primers</i> e/ou sondas utilizadas no presente estudo com indicação da respetiva sequência e localização no genoma do VIH-1.	19
Tabela 3.2 – <i>Primers</i> utilizados em PCR Convencional para gerar os produtos de PCR posteriormente utilizados nos ensaios experimentais de PCR em Tempo Real, com indicação do tamanho dos fragmentos obtidos em cada amplificação.	20
Tabela 3.3 – Caracterização de amostras incluídas no programa <i>QCMD</i> de 2009.	22
Tabela 3.4 – Programa de amplificação por PCR Convencional para amostras de ADN e ADNc utilizando o sistema <i>illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads</i> .	26
Tabela 3.5 – Programa de amplificação por PCR convencional para amostras de ADN e ADNc utilizando <i>AmpliTaq® Gold</i> .	26
Tabela 3.6 – Programa de amplificação por PCR em Tempo Real a partir de amostras de ADN ou de produtos previamente amplificados por PCR Convencional utilizando os <i>primers</i> e a sonda adequada para amplificação da região LTR ou <i>pol</i> do VIH-1.	27
4. Resultados	
Tabela 4.1 – Resultados obtidos com as amostras do programa <i>QCMD</i> de 2009, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	29
Tabela 4.2 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real para as amostras incluídas no programa <i>QCMD</i> de 2009 testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.	30
Tabela 4.3 – Resultados obtidos com as amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	31
Tabela 4.4 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real para as amostras ADN VIH-1 positivas testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.	31
Tabela 4.5 – Resultados obtidos com as amostras de ADN complementar de casos de infeção VIH-1 obtidas a partir de ARN viral extraído do plasma, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, na forma de ADN complementar e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	32
Tabela 4.6 – Resultados obtidos com as amostras de ADN VIH-2 positivas quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	33
Tabela 4.7 - Resultados obtidos com as amostras do programa <i>QCMD</i> de 2009, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	34

Tabela 4.8 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real nas amostras incluídas no programa <i>QCMD</i> de 2009 testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real B.	34
Tabela 4.9 – Resultados obtidos com as amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B, na forma de ADN e na forma de potencial produto, resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	35
Tabela 4.10 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real nas amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real B.	35
Tabela 4.11 – Resultados obtidos com as amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real D, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.	37
Tabela 4.12 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos neste estudo por PCR em Tempo Real nas amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP testadas no ensaio experimental D.	37
Tabela 4.13 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real submetendo previamente as amostras clínicas a reação de PCR Convencional para posteriormente serem utilizadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.	39
Tabela 4.14 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real submetendo previamente as segundas amostras a reação de PCR Convencional para posteriormente serem utilizadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.	39

5. Discussão

Tabela 5.1 – Comparação entre os resultados obtidos previamente com a técnica de <i>nested</i> PCR e os resultados obtidos neste estudo com o ensaio de PCR em Tempo Real A para as 128 amostras positivas.	44
Tabela 5.2 – Comparação entre os resultados obtidos previamente com a técnica de <i>nested</i> PCR e os resultados obtidos neste estudo com o ensaio de PCR em Tempo Real A para as 21 segundas amostras.	44

1. Introdução

1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)

Em 1983, o isolamento de um novo retrovírus humano a partir do nódulo linfático de um indivíduo com linfadenopatia [1] mais tarde designado de Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), marcou o início da investigação da patogenicidade do agente causativo da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) [2,3].

São conhecidos dois tipos de vírus, o VIH-1 e o VIH-2 [4], que evoluíram a partir de diferentes Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) [5]. Estes dois tipos são distinguíveis ao nível da organização genómica e das relações filogenéticas com outros lentivírus de primatas [1,6].

O Homem não é um hospedeiro natural para o VIH [6] mas fortes evidências filogenéticas sugerem que o VIH-1 teve origem numa transmissão zoonótica entre espécies do SIV, a partir de chimpanzés (*Pan troglodytes*) para os humanos [6–8]. Esta hipótese é fundamentada pelas semelhanças na organização do genoma dos vírus, relações filogenéticas, prevalência no hospedeiro natural, deteção do vírus em áreas geográficas específicas e rotas de transmissão similares [6,7]. Apesar desta homologia entre o SIV e o VIH, os lentivírus de símios não causam doença nos seus hospedeiros naturais [6,9,10], enquanto o VIH causa danos no sistema imunitário do hospedeiro, deixando o organismo suscetível ao aparecimento de infeções oportunistas [5].

O VIH encontra-se entre os agentes patogénicos geneticamente mais variáveis que afetam o Homem. A infeção ocorre através de uma população de vírus não-idênticos mas altamente relacionados chamada de *quasispecies* [11,12].

Em África, o contacto frequente entre o homem e espécies de primatas não-humanos infetados facilitou a transmissão entre espécies do vírus e poderá ser a explicação para os atuais múltiplos grupos e subtipos de VIH existentes no Mundo [6]. No entanto, muitos destes contactos não originam infeções produtivas devido à inviabilidade do vírus, sendo a infeção eliminada. A razão pela qual a pandemia da SIDA apenas evoluiu no século XX ainda não está determinada [13] mas poderá dever-se a mudanças culturais e sociais das populações [14–17]. Também as características inerentes à forma de replicação do vírus permitem que este evolua rapidamente, gerando variantes víricas após algumas gerações. A infeção VIH resulta numa doença insidiosa, persistente, apresentado latência clínica, taxas de mutação e de recombinação genética elevadas com possibilidade de algumas variantes víricas poderem escapar ao sistema imunitário e aos anti-retrovíricos [6].

1.1.1 Morfologia e Organização Genómica

De acordo com o Comité Internacional para a Classificação Taxonómica dos Vírus (ICTV), o VIH pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao género Lentivírus [18].

A principal característica dos retrovírus advém de possuírem uma enzima denominada transcriptase reversa (TR) com capacidade de converter genomas de ARN em genomas de ADN de dupla cadeia aquando da infeção [19]. Os lentivírus caracterizam-se por possuírem genomas complexos e uma cápside cónica [20].

As partículas virais apresentam forma esférica, com diâmetro de aproximadamente 110 nm, com uma cápside revestida por uma matriz e um invólucro que são essenciais para manter a integridade do virião [20–22].

1. Introdução

O VIH-1 tem um genoma com cerca de 9,8 kb [23], de ARN de cadeia simples de sentido positivo [4,5]. O virião contém duas cópias de ARN [4,24], as proteínas Nef, Vif, Vpr e p6 e as enzimas Integrase (IN), TR e Protease (PR) (Figura 1.1) [5,20,21]. O genoma contém três genes principais ou estruturais comuns a todos os Retrovírus que são o *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (polimerase) e *env* (proteínas do invólucro) (Figura 1.2)[5,25,26].

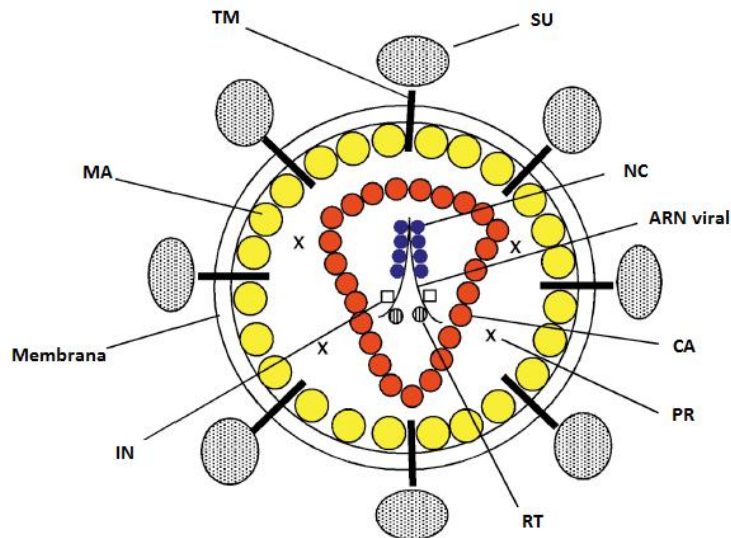


Figura 1.1 – Representação esquemática da partícula VIH (Adaptado) [27].

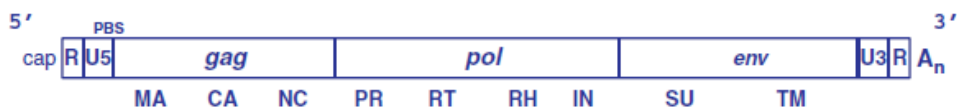


Figura 1.2 – Organização dos genes e principais proteínas do genoma do VIH (Adaptado) [5].

O gene *gag* codifica um precursor de uma poliproteína que irá ser clivada de modo a formar as proteínas da matriz (MA ou p17), da cápside (CA ou p24), da nucleocápside (NC ou p7) e a p6. O gene *pol* origina as enzimas RT, PR e IN. E por último, o gene *env* que codifica glicoproteínas de superfície (SU ou gp120) e transmembranares (TM ou gp41) [5,26].

Para além destes genes estruturais, o genoma inclui também genes reguladores (*Tat* e *Rev*) e genes acessórios (*Vpu*, *Vif*, *Vpr*, *Nef*) que têm como função controlar a expressão genómica, o transporte de componentes virais e interferir com a resposta imunitária do hospedeiro [5,25,26].

Nas extremidades 3' e 5' do genoma existem sequências terminais repetitivas longas (LTR), que controlam a iniciação e transcrição do genoma e regulam a produção de viriões [25].

1.1.2 Ciclo Replicativo

A replicação do VIH compreende duas fases denominadas de fase precoce e de fase tardia. Na fase precoce há o reconhecimento da célula alvo e respetiva infeção enquanto na fase tardia existe expressão génica e formação de viriões [22,26].

1. Introdução

A fase precoce inicia-se com a ligação do virião ao seu recetor, a molécula CD4 [22,26] sendo as células T CD4⁺ o seu principal alvo [5]. Mas para que ocorra entrada do vírus na célula, é necessário também que este se ligue a um coreceptor existente na superfície da célula hospedeira, o CCR5 ou o CXCR4 [5,26]. A capacidade do VIH estabelecer uma infeção produtiva dependerá também da expressão de coreceptores nas células T CD4⁺ [28,29].

Após estas ligações se estabelecerem, ocorrem rearranjos estruturais que resultam na fusão da membrana do virião com a membrana da célula hospedeira, e posterior libertação do conteúdo do invólucro viral para o citoplasma celular [5,26,30]. A cápside degrada-se deixando o ARN livre para a ação da TR [5,21,26] e formação do ADN complementar (ADNc) [31].

Uma cadeia dupla de ADN é formada e transportada até ao núcleo onde será integrada no genoma da célula hospedeira [32–34] pela ação da enzima IN [20,21,26]. O ADN integrado mantém-se latente até que surjam sinais que iniciem a sua transcrição [21,26]. Na fase latente as células infetadas copiam o provírus para cada uma das células-filhas [5].

No início da fase tardia há transcrição de ARN mensageiro (ARNm) e de novos genomas virais a partir do provírus [5,22,26], que são transportados para fora do núcleo para que ocorra a tradução das proteínas estruturais, regulatórias e acessórias que irão ser utilizadas durante a replicação viral [26,30]. Depois da síntese de todas as proteínas virais inicia-se o processo de montagem da partícula viral [27,35].

O virião imaturo adquire o seu invólucro através da passagem pela membrana celular do hospedeiro [5,26], passando posteriormente por um processo de maturação no qual as proteínas estruturais sofrem rearranjos e clivagens por ação da PR, de modo a se formar uma partícula viral infecciosa [20,26].

O título do ADN proviral e a quantificação do ARN plasmático representam dois marcadores importantes para monitorizar, respetivamente, as reservas e a replicação do vírus [32].

1.1.3 Imunopatogénese

O curso típico de uma infeção por VIH-1 inclui uma fase aguda, um período de latência clínica e uma fase final da doença. Na fase aguda pode existir uma síndrome de severidade variável enquanto a fase final é caracterizada pelo aumento da suscetibilidade a infeções oportunistas e doenças neoplásicas com a progressão para o estágio de SIDA [23,36].

Na infeção em fase aguda surge uma virémia elevada acompanhada por uma queda transitória dos níveis de células T CD4⁺ no sangue periférico [5,37,38]. Neste período podem ocorrer sintomas similares a uma gripe ou uma mononucleose infecciosa que se podem prolongar por algumas semanas [5,39,40]. Na maioria dos indivíduos, a infeção aguda origina uma replicação viral persistente, e na ausência de terapêutica anti-retrovírica, a virémia continuará detetável durante a progressão da infeção [2].

Na fase de latência clínica o sistema imunitário responde de modo a controlar a replicação viral e a infeção passa a ser assintomática mas continua a existir replicação viral intensa [38]. A infeção persiste apesar da resposta imunitária, pois o principal tipo de células infetadas são as T CD4⁺ que também estão envolvidas na resposta imunitária. Durante algum tempo o organismo é capaz de tolerar a infeção substituindo rapidamente as células destruídas. Porém a concentração das T CD4⁺ acaba por decair, aumenta o nível de virémia e desenvolve-se a SIDA. Esta síndrome é caracterizada por uma disfunção imune e neurológica

1. Introdução

[40], pela existência de uma contagem de linfócitos inferior a 200 células por microlitro [38] e pelo aparecimento de infeções oportunistas que podem levar à morte [38,41]. Outras doenças podem manifestar-se nesta fase, sendo o sarcoma de Kaposi e o linfoma não-Hodgkin as neoplasias mais frequentemente associadas à SIDA [5].

A seroconversão, ou seja, a produção de anticorpos anti-VIH, ocorre cerca de 2 a 8 semanas após a infeção [4,42]. Cerca de 12 semanas após a infeção começam a aparecer os designados anticorpos neutralizantes. No entanto, esta resposta aparenta ser ineficaz e tardia, pois os vírus suscetíveis à neutralização são rapidamente substituídos por vírus resistentes [43,44].

Existe uma grande variabilidade na progressão da doença de indivíduo para indivíduo, em particular na duração do período de latência clínica em que continuam a existir altas concentrações de VIH no plasma e nos tecidos linfóides [23,45]. Estima-se que na ausência de intervenção terapêutica a progressão para SIDA ocorra após um período médio de 8 a 10 anos [5,45]. Contudo, a progressão da doença depende de vários fatores nomeadamente o nível de ARN e o tipo de vírus, o nível das células T CD4⁺, a idade na altura da seroconversão e a idade dos indivíduos [33,46].

Durante a fase primária da infeção desenvolvem-se reservatórios de VIH [47] que se tornam um dos maiores obstáculos à erradicação do vírus do hospedeiro infetado mesmo sob o efeito de terapêuticas de elevada eficácia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) [2,34,48–50].

Reservatórios de VIH podem ser encontrados em tecidos linfáticos que permitem que o vírus possa entrar rapidamente em contacto com um grande número de células alvo, resultando na ampla disseminação da infeção. Também os reservatórios celulares (células mononucleadas do sangue periférico - CMSP), que consistem maioritariamente em células T CD4⁺, podem conter vírus latentes [2,49,50] e são caracterizadas por um turnover lento, assim permanecem mais tempo em circulação o que possibilita uma maior disseminação viral [33,50–52].

1.1.4 Vias de Transmissão

A transmissão do VIH está relacionada com a concentração de vírus infecciosos que existe num determinado fluido corporal e o tempo de contacto com esse mesmo fluido [23].

O VIH é transmitido por contacto sexual, que representa a via de transmissão mais comum em todo o Mundo, e também pela exposição a sangue contaminado (p. ex. transfusões e partilha de agulhas contaminadas) [12].

A maioria das infeções VIH em crianças ocorre por transmissão vertical [12], durante a gravidez (*in útero*) ou durante o parto (*intrapartum*). No entanto, o vírus também pode ser transmitido durante o período de aleitamento materno [53,54].

A transmissão *in útero* ocorre devido à exposição do feto a células infetadas existentes no líquido amniótico ou na placenta da grávida infetada. Durante o parto também podem ocorrer microtransfusões entre o sangue da mãe e do feto. A ocorrência de nascimentos prematuros e de partos em que ocorreu rutura das membranas aumenta o risco de transmissão do vírus da mãe ao filho [55]. No período de amamentação as células infetadas do leite materno podem penetrar na mucosa intestinal do recém-nascido ou entrar diretamente na corrente sanguínea [56,57]. Na ausência de prevenção, o risco de transmissão do VIH-1 é

1. Introdução

elevado em crianças amamentadas por leite materno, e este risco aumenta com o prolongamento da amamentação no tempo [56].

A avaliação da infecção VIH/SIDA na grávida infetada deverá incluir a realização periódica de exames físicos e clínicos, e deverá também ser verificado se as linhas de orientação de prevenção da transmissão vertical de VIH estão a ser cumpridas. Neste contexto a monitorização laboratorial é importante pois pode confirmar se o número de células T CD4⁺ se mantém dentro de limites normais (valores entre os 500 e 1400 células/mm³) e se a carga viral se mantém controlada (abaixo de 50 cópias/mm³) [56].

1.1.5 Terapêutica Anti-retrovírica

A terapêutica anti-retrovírica contra a infecção VIH/SIDA teve início nos anos 80 com a administração de zidovudina (AZT) em doentes infetados [58]. Com o aumento do número de anti-retrovíricos produzidos e de ensaios clínicos comprovou-se que a combinação de vários fármacos trazia mais benefícios comparativamente à monoterapia [59,60]. A terapêutica combinada reduzia os níveis de ARN viral e aumentava a contagem de células T CD4⁺, prevenindo as resistências aos fármacos e a morte por SIDA [61,62].

A administração da terapêutica HAART foi iniciada em 1996 [63,64] e consiste no uso de três anti-retrovíricos de diferentes classes [65]. Nos últimos 20 anos, estes fármacos têm sido responsáveis pela diminuição das taxas de morbilidade e de mortalidade em populações tratadas [66–69].

No entanto, embora a terapêutica HAART possa limitar o aparecimento de infeções oportunistas não consegue eliminar o vírus do organismo [46,49,70,71] mesmo após 2 ou 3 anos de tratamento efetivo [72]. A terapêutica anti-retrovírica também diminui o título de ADN proviral, mas a taxa de decréscimo é menor comparativamente com o título de ARN viral, e pode permanecer detetável mesmo após tratamento prolongado [73].

Em grávidas infetadas, a terapêutica anti-retrovírica deve ser administrada, ou como tratamento, ou como estratégia de prevenção da transmissão do vírus ao filho, dependendo da situação clínica e imunológica materna e seguindo as linhas de orientação publicadas [65].

Ainda no âmbito da prevenção da transmissão vertical do VIH, o recém-nascido faz profilaxia anti-retrovírica durante as primeiras 4-6 semanas de vida [74,75]. As medidas de prevenção adotadas em países desenvolvidos permitiram uma redução, nos últimos anos, do risco de transmissão vertical de 30-40% para valores inferiores a 2% [76].

1.2 Prevalência e Epidemiologia Molecular da Infecção VIH-1

A infecção por VIH-1 é pandémica e a principal causa de SIDA no Mundo [4].

O crescimento global do número de casos de infecção VIH parece ter estabilizado, com o número de novas infeções a decrescer ligeiramente desde o final da década de 90 [75]. Contudo, e apesar da África subsariana continuar a ser o epicentro global da infecção, as taxas de infecção aumentaram nos últimos tempos na antiga União Soviética e em partes da Ásia, incluindo a Índia e a China [6]. Apesar dos esforços preventivos, na ausência de uma vacina efetiva, estima-se que irão continuar a existir taxas de infecção substanciais [12].

O último relatório da OMS (Organização Mundial de Saúde) aponta para a existência de cerca de 34 milhões de pessoas infetadas com VIH no Mundo. Cerca de 10% dos casos são

em crianças e 50% dos casos em mulheres. Para o ano de 2010 estimou-se a ocorrência de 2,7 milhões de novas infeções e 1,8 milhões de mortes devido à SIDA [75]. Em Portugal, até 31 de Dezembro de 2010 foram notificados, ao núcleo de vigilância laboratorial de doenças infecciosas no INSA, 39347 casos de infeção por VIH/SIDA [77].

A transmissão da mãe ao filho do VIH é a principal via de infeção em crianças. Na ausência de tratamento, esta infeção pode conduzir ao desenvolvimento de SIDA logo nos primeiros anos de vida [78,79]. Estimou-se que no ano de 2010 cerca de 250 mil crianças morreram devido à progressão da infeção. A maioria destes casos ocorreu em países com recursos económicos limitados, onde o diagnóstico e o tratamento são escassos e a morbilidade e mortalidade elevadas. Contudo, estimou-se também que 48% das mulheres grávidas infetadas por VIH usufruíram de regimes anti-retrovíricos efetivos, evitando a transmissão do vírus em mais de 350 mil crianças [75].

A classificação do VIH-1 subdivide os vírus em quatro grupos filogenéticos: M (*major*), N (*non-M/non-O*), O (*outlier*) [7,12,80–83], e mais recentemente, o grupo filogenético P [84].

Enquanto os casos de infeção VIH pertencentes aos grupos filogenéticos O, N e P são raros e estão, essencialmente, descritos nos Camarões e na África Central [12,84,85], os vírus pertencentes ao grupo M são responsáveis por mais de 90% das infeções mundiais [82,83,86,87]. Este grupo está dividido em 9 subtipos, A-D, F-H, J e K, [80–83,88] incluindo 55 formas recombinadas em circulação (*CRF, Circulating Recombinant Forms*) [89]. A classificação do VIH-1 em grupos e subtipos baseia-se na semelhança das sequências nucleotídicas de múltiplas regiões subgenómicas (*gag, pol e env*) ou na análise do genoma completo [90].

O subtipo A inclui os sub-subtipos A1 a A4 [82,88,91] e é mais prevalente na Europa do Leste, Ásia Central e África Oriental e Central [12,90,92]. O subtipo B é o mais comum na Europa, na América do Norte e na Austrália, apesar de nos últimos anos ter existido um aumento de infeções por subtipos diferentes de B (não-B) fundamentada pela migração das populações. O subtipo C é mais frequente na Índia, China e África [12,90,92]. Os restantes subtipos possuem baixa prevalência e existem principalmente na África Central e Ocidental, embora possam também existir noutras regiões. A exceção é o subtipo F que possui dois sub-subtipos (F1 e F2) e pode ser encontrado na América do Sul [12,82,90].

Na Europa, onde a infeção pelo subtipo B tem sido dominante nos grupos de risco (utilizadores de drogas injetáveis e homossexuais), as infeções pelos subtipos não-B e algumas *CRF* têm vindo a ser introduzidos na população em associação com o aumento da transmissão heterossexual entre migrantes de regiões onde a infeção é endémica [93,94].

Portugal possui um perfil molecular de infeções único que o distingue do resto dos países europeus [95,96]. Caracterizando-se por uma elevada prevalência de subtipos de VIH não-B e formas recombinantes [96,97] Devido à diversidade genética do vírus no país, este perfil pode colocar desafios para o diagnóstico molecular da infeção [98]. Em Portugal, tem sido observado um aumento da proporção de casos de infeção com o subtipo G, na sua forma pura ou recombinada com o subtipo A [95,99]. Mais recentemente, uma elevada diversidade genética da infeção por VIH numa população de mães infetadas, transmissoras e não transmissoras do VIH aos filhos mostrou que os subtipos G e B e as formas recombinantes AG e BG são responsáveis pela maioria das infeções (84,5%) identificadas no grupo estudado [100].

Vários fatores podem influenciar a elevada taxa de variabilidade do VIH. A não existência de um mecanismo de correção de erros cometidos pela TR [5,101], o rápido *turnover in vivo* [102], a pressão do sistema imunitário do hospedeiro [103] e a pressão

1. Introdução

seletiva dos anti-retrovíricos são algumas das razões para a diversidade do VIH. A ocorrência de eventos de recombinação genética, resultando na formação de um genoma mosaico, caso a célula tenha sido infetada por um genoma heterozigótico, é também uma das principais formas de produção de variantes virais [24,102].

A diversidade genética tem implicações negativas para a deteção do vírus através de ensaios moleculares [90] e dificulta a produção de uma vacina eficaz contra a infeção VIH [85]. Os vírus com potenciais infecciosos distintos podem recombinar entre si, originando variantes eventualmente mais transmissíveis ou resistentes à terapêutica [90,104].

1.3 Métodos Moleculares de Diagnóstico da Infeção VIH-1

Os métodos mais usuais para detetar a infeção por VIH em adultos são os ensaios serológicos com pesquisa de anticorpos anti-VIH. No entanto estes ensaios são limitados no diagnóstico de infeções para alguns casos específicos [105].

Métodos de amplificação para a deteção de ácidos nucleicos virais são considerados como uma abordagem específica e sensível para detetar a infeção VIH em indivíduos em que ainda não ocorreu seroconversão, em recém-nascidos e em casos de esclarecimento de resultados serológicos indeterminados [4,68].

Crianças nascidas de mães infetadas apresentam anticorpos anti-VIH maternos que podem persistir até aos 12-15 meses de vida [106]. O método de amplificação por PCR com deteção de ADN proviral VIH é aceite como sendo *gold standard* para diagnóstico precoce da transmissão do vírus da mãe ao filho [107]. Este diagnóstico deve ser efetuado o mais precocemente possível para que a criança possa iniciar uma terapêutica adequada [108], reduzindo o risco de progressão para SIDA nos seus primeiros anos de vida [107,109].

A quantificação do número de cópias de ARN de VIH-1 no plasma (carga viral) é o principal indicador no prognóstico da progressão da doença, tendo um importante papel na monitorização da eficácia dos anti-retrovíricos [96,110,111].

A quantificação do ADN proviral, tanto nas CMSP como no tecido linfático, pode ser útil para monitorizar os pacientes e pode servir como marcador quando o ARN baixa para valores indetetáveis [33,112]. Também pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas envolvendo a formulação de fármacos que combatem o vírus em várias fases do seu ciclo de replicativo [113,114].

A reação de amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*) e a evolução de técnicas de PCR convencionais para PCR em Tempo Real permitiram um avanço no diagnóstico de agentes infecciosos [115]. Contudo a variabilidade genética do VIH pode causar problemas significativos na sensibilidade e especificidade dos testes moleculares de diagnóstico [90].

1.3.1 Reação de Amplificação por PCR Convencional

A reação de PCR, descoberta em 1986 [116], é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de um fragmento específico de ADN, que se situa entre duas regiões conhecidas [117], resultando num grande número de cópias idênticas [118].

A reação é feita a partir de moldes de ADN, que podem ser de cadeia simples ou cadeia dupla. Para ocorrer reação de amplificação são necessários dois *primers* (direto e complementar reverso), a amostra alvo contendo a sequência de ADN a ser amplificada,

1. Introdução

dNTPs, uma polimerase de ADN e respetivo tampão de reação com iões de magnésio [117,119].

Cada ciclo de PCR ocorre de acordo com o princípio natural de replicação de ADN e pode ser sumarizada em três passos: desnaturação da dupla cadeia de ADN, geralmente a temperatura igual ou superior a 90°C; hibridação dos *primers* com temperatura dependente do seu ponto de fusão geralmente entre 40 e 60°C; e síntese ou extensão da sequência alvo, geralmente à temperatura ótima da polimerase, 72°C [119]. A quantidade de sequências duplica a cada ciclo, resultando no final uma acumulação exponencial de produto [57,120].

A temperatura de hibridação depende dos *primers*, que devem ter temperaturas de desnaturação semelhantes para formarem complexos estáveis com a sequência alvo [118].

Os ciclos de temperatura, o tempo de incubação a cada temperatura e o número de repetições de ciclos são controlados por um termociclador de acordo com uma programação escolhida [118], sendo que o número de ciclos depende da quantidade de sequência alvo e da eficiência da reação [121].

O passo final da PCR é a deteção do produto amplificado no *end-point*, ou seja, após a reação estar concluída [121] sendo feita uma eletroforese em gel de agarose na presença de brometo de etídio ou outro corante intercalador. Os fragmentos resultantes são analisados, após irradiação do gel com luz ultravioleta [117,119].

Na mistura de reação de PCR, a presença de eventuais inibidores da amostra, a concentração limitante de reagentes ou a acumulação de subprodutos pode levar ao término da reação, deixando de se formar produto. Isto torna difícil a quantificação no *end-point*, pois reações replicadas podem gerar diferentes quantidades de produto, diminuindo a reprodutibilidade de resultados. Assim, apenas durante a fase exponencial é possível extrapolar a quantidade inicial de ADN [122].

Na reação de amplificação por PCR Convencional um par de *primers* produz um fragmento amplificado que pode ser visualizado após corrida eletroforética em gel de agarose. No entanto, este produto amplificado pode ser submetido a uma nova amplificação numa reação designada de *nested* PCR. Deste modo o primeiro par de *primers* (externos) produz um fragmento maior, que vai ser utilizado como molde para a hibridação de um segundo par de *primers* (internos) que produz um subfragmento de menores dimensões [116]. A sensibilidade e especificidade da reação amplificação podem aumentar significativamente ao usar este procedimento. A especificidade aumenta devido a uma eliminação de muitos dos produtos não específicos eventualmente amplificados na primeira reação de PCR que não servem de molde para a segunda reação de amplificação. A principal desvantagem desta dupla amplificação é o elevado risco de contaminação pelo manuseamento dos produtos amplificados aquando da realização da segunda reação de PCR [117].

Outra versão de *nested* PCR são os designados *heminested* PCR, em que existe repetição de um *primer* externo na segunda reação de amplificação, juntamente com um novo *primer* interno ao fragmento obtido na primeira reação [117].

1.3.2 Reação de Amplificação por PCR em Tempo Real

A PCR em Tempo Real foi documentada pela primeira vez em 1993 por Higuchi [123] e permite fazer em simultâneo a amplificação e a deteção ou quantificação do produto, eliminando a necessidade da manipulação dos produtos amplificados [124]. Este método

1. Introdução

combina a tecnologia de amplificação por PCR com a detecção do produto em tempo real através do uso de corantes fluorescentes no mesmo tubo de reação [125,126].

A escolha do local de hibridação dos *primers* no genoma para amplificação de uma região de interesse deve ter em conta que os produtos resultantes da amplificação devem ser fragmentos pequenos para uma maior eficiência das reações. No caso da PCR em Tempo Real, fragmentos considerados de tamanho ideal variam entre 50 a 150 pb [122].

O ciclo de PCR em Tempo Real a partir do qual o sinal de fluorescência é detetado designa-se de ciclo *threshold* (Ct) [118,127–129]. Uma maior concentração de ADN alvo no início da reação leva a que seja necessário menos ciclos para que o sinal de fluorescência ultrapasse o limiar de *threshold* [130].

A progressão da reação de PCR em Tempo Real passa por duas fases distintas, a fase exponencial e a fase de *plateau*. Na fase exponencial potencialmente existe a desnaturação de todas as cadeias de ADN de dupla cadeia, hibridação dos *primers* com síntese dos produtos através da ação da polimerase. Esta fase é sensivelmente metade do total dos ciclos da reação. O número de ciclos que a reação demora a entrar na fase exponencial depende da quantidade inicial de ADN alvo, por isso nenhum intervalo específico pode ser definido, devendo ser identificados experimentalmente para cada sistema [121].

Durante os primeiros ciclos da reação, o sinal de fluorescência é fraco e não se consegue distinguir do *background*. Com o incremento da quantidade de produto formado o sinal de fluorescência aumenta exponencialmente [118], até que se atinge a fase *plateau* que corresponde aos ciclos finais da reação. Esta fase de *plateau* é atingida pela limitação dos reagentes, inativação da polimerase ou redução da eficiência da desnaturação (Figura 1.3) [131].

O sinal de fluorescência é detetado por um termociclador adaptado com um *software* que traduz graficamente em tempo real os dados da emissão de fluorescência obtidos durante a amplificação [122].

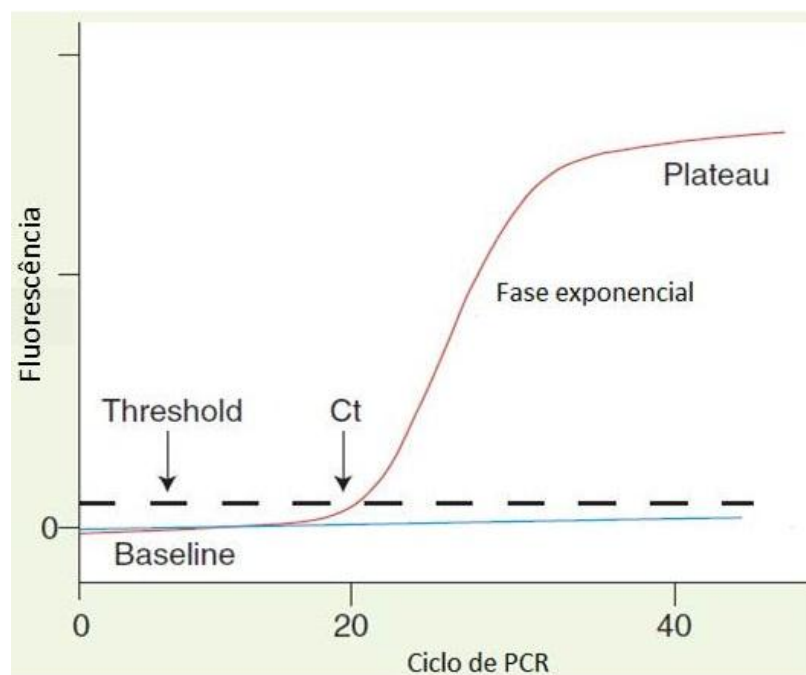


Figura 1.3 – Representação gráfica do processo de reação de PCR em Tempo Real (Adaptado) [122].

1. Introdução

Holland *et al* demonstraram que a Polimerase de ADN tinha atividade exonucleásica de 5' para 3' [132]. Esta atividade permite a clivar sequências hibridadas com o ADN alvo, que surjam durante a síntese da nova cadeia [117]. Com base neste conhecimento, este grupo mostrou também que a clivagem de uma sonda durante a reação de PCR pela atividade exonucleásica da polimerase de ADN podia ser usada para detetar a amplificação do produto em tempo real [132].

As sondas designadas de TaqMan (5'Nuclease) são utilizadas para detetar produtos de PCR, em que um sinal fluorescente é gerado durante a amplificação e detetado no tubo de reação em tempo real. Para tal é necessário que a sonda se encontre marcada com um *reporter* na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3' [130,132–135]. A extremidade 3' é marcada de forma a não existir extensão da cadeia, assegurando que a sonda não funcione como *primer* [122,132]. Na marcação das sondas podem ser usados vários corantes, FAM, TET, HEX ou VIC como *reporter* e TAMRA ou DABCYL como *quencher* [117,122].

A reação tem início quando a sonda marcada nas extremidades 5' e 3' se liga à cadeia complementar de ADN [125]. Devido à proximidade dos corantes estes sofrem FRET (*Fluorescente Resonance Energy Transfer*) antes da clivagem [129], ou seja, quando a sonda está intacta há emissão de energia pelo *reporter* num comprimento de onda específico, que é transferida para o *quencher* que dissipa essa energia sob a forma de calor [122,123,129,132,133]. Simultaneamente, a síntese da cadeia efetuada a partir do local de hibridação dos *primers* à sequência alvo pela Taq polimerase leva a que a sonda seja clivada pela atividade de exonuclease de 5' para 3' da enzima interrompendo o FRET entre o *quencher* e o *reporter* da sonda (Figura 1.4) [122,129,130,132–134,136]. A clivagem separa a sonda da sequência alvo a amplificar, permitindo a sua síntese através dos *primers*, não interferindo assim com a acumulação exponencial de produto [122]. A quantidade de corante *reporter* libertado é proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificado. No caso da sonda não hibridar com a sequência alvo, esta fica intacta e não emite fluorescência detetável [122,136].

1.3.3 Vantagens e Desvantagens

O desenvolvimento da técnica de PCR em Tempo Real permite a quantificação do produto final amplificado, permitindo extrapolar a quantidade inicial de ADN alvo na amostra. Contrariamente, a maioria dos ensaios de PCR Convencional são qualitativos e a quantidade inicial de ADN apenas pode ser estimada com base no resultado da corrida eletroforética [137].

Devido à amplificação exponencial do ADN, na técnica convencional qualquer variação durante a reação de amplificação pode levar a grandes variações na quantidade de produto final amplificado [137,138]. Assim, a vantagem da técnica de PCR em Tempo Real reside no fato de esta não se basear na quantidade de produto final para a extrapolação da quantidade de ADN [137,139], mas sim na quantidade de produto formado na fase exponencial, onde as condições de reação são ótimas [129,130,137] e existe uma forte correlação entre o *threshold* e a quantidade inicial de ADN na amostra [112,122,123,127].

1. Introdução

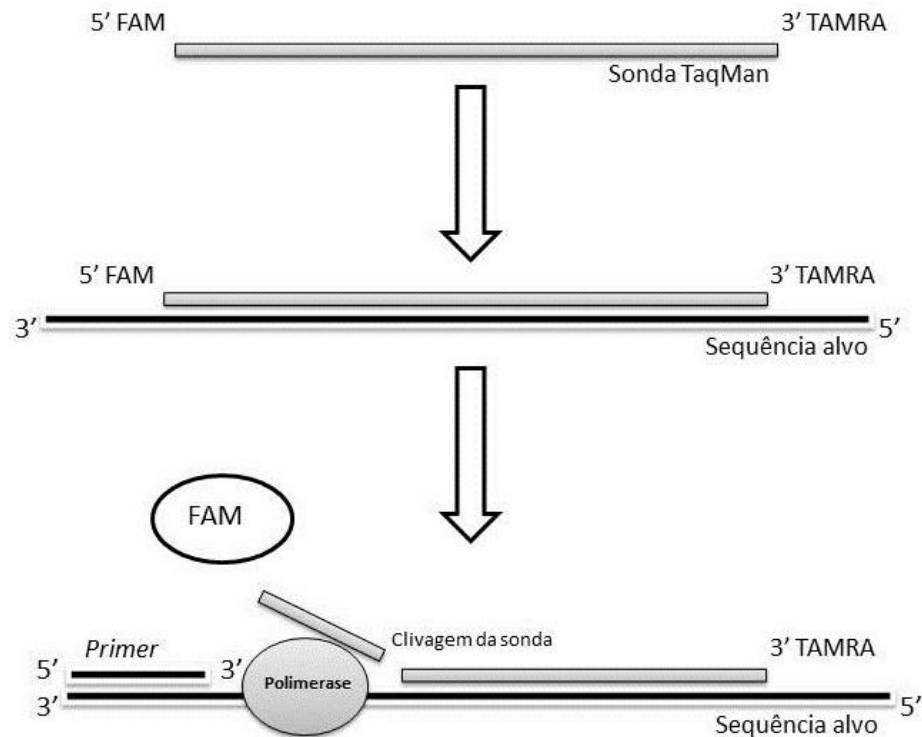


Figura 1.4 – Esquema de atividade das sondas TaqMan marcadas com FAM e TAMRA.

No caso da técnica de PCR em Tempo Real, a quantificação do produto amplificado é feita através da medição da fluorescência emitida pelo corante *reporter* da sonda [140]. Esta técnica permite também a análise de várias amostras em simultâneo sem a preocupação que atinjam a fase *plateau* em tempos de reação diferentes [129]. Tipicamente, na técnica de PCR em Tempo Real, todas as curvas de reação saturam ao mesmo tempo [118].

Por outro lado, a implementação da técnica de PCR em Tempo Real permitiu colmatar algumas das desvantagens da reação de PCR Convencional, como o elevado risco de contaminação, especialmente no caso de reações de *nested* e *heminested* PCR, em que existem duas amplificações consecutivas. Também a fraca capacidade de quantificação [127,138] e a baixa reprodutibilidade da quantidade de ADN amplificado entre reações são consideradas desvantagens na PCR Convencional [138].

A técnica de PCR em Tempo Real permitiu um aumento do rendimento e automatização das reações, diminuindo o risco de erro humano e o tempo de realização dos ensaios [122,125,141]. Esta evolução deve-se ao fato da técnica de PCR em Tempo Real possuir baixa variabilidade inter e intra ensaio, uma elevada sensibilidade e especificidade e uma grande precisão [127,141], com elevada reprodutibilidade de resultados [122,129,137].

A utilização de sondas na reação de amplificação por PCR em Tempo Real leva a um aumento de especificidade da reação, pois será necessário que exista hibridação específica tanto do par de *primers* como da sonda com a sequência alvo para que possa ocorrer amplificação e aparecimento de fluorescência [122,139]. É possível utilizar várias sondas na mesma reação de PCR em Tempo Real, permitindo a deteção de múltiplas sequências alvo num único tubo de reação [135].

1. Introdução

Também o fato de a reação de PCR em Tempo Real ser efetuada num sistema fechado, que não requer processamento pós-PCR das amostras, diminui o risco de contaminações [122,129,137].

Outras vantagens da reação de PCR em Tempo Real incluem um amplo intervalo dinâmico de detecção [128,141] evitando a necessidade de diluição das amostras e repetição dos ensaios devido a resultados fora dos limites de detecção [142]. O que pode ocorrer frequentemente em ensaios de quantificação de ARN VIH-1 (carga viral) no momento inicial da infecção [128,141].

No entanto, o tempo e o trabalho empírico e experimental necessário para otimização da reação de amplificação de PCR em Tempo Real a novas aplicações surgem como uma das grandes desvantagens desta técnica [134]. Também a incapacidade de determinar o tamanho do produto e a incompatibilidade de alguns sistemas como químicos fluorogénicos são apresentadas como desvantagens [122].

2. Objetivo

2. Objetivo

Para um diagnóstico laboratorial precoce da transmissão do VIH da mãe ao filho, o Laboratório Nacional de Referência desenvolveu uma técnica de PCR convencional com pesquisa de ADN VIH-1 (*nested* PCR) e deteção dos produtos amplificados através de uma eletroforese em gel de agarose.

É fundamental nesta área de diagnóstico, que a metodologia selecionada possua uma sensibilidade elevada para detetar a infeção e, que simultaneamente possa permitir obter resultados rápidos para uma reposta atempada. De facto, na ausência de diagnóstico ou tratamento, crianças infetadas por transmissão vertical podem desenvolver SIDA nos primeiros anos de vida.

As amostras clinicas estudadas correspondem a uma população de mães e filhos, cujo sangue foi colhido para estudo da transmissão vertical de VIH-1 entre 2009 e 2011.

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um método de PCR em Tempo Real, alternativo ao *nested* PCR utilizado no Laboratório, que possa conduzir à obtenção de ganhos na sensibilidade do ensaio e à redução do tempo de processamento das amostras.

Para se atingir o objetivo principal foram seguidos os seguintes objetivos específicos:

- Desenho de ensaios experimentais de PCR em Tempo Real nas regiões LTR e *pol* do VIH-1 e sua avaliação com amostras de referência.
- Recolha de informação sobre a população de amostras clinicas, nomeadamente: idade, naturalidade, terapêutica de prevenção (sim ou não) e valores de ARN VIH-1 (carga viral) dos indivíduos infetados.
- Escolha de um modelo experimental adequado à deteção da infeção VIH-1 por PCR em Tempo Real.
- Análise e comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados.
- Determinação da sensibilidade e especificidade do ensaio experimental de PCR em Tempo Real.
- Comparação dos resultados do ensaio de PCR em Tempo Real com os resultados previamente conhecidos obtidos com a técnica de *nested* PCR.

3. Material e Métodos

3.1 Diagrama Geral do Estudo

O desenvolvimento de uma nova técnica *in house* para deteção do VIH-1 foi fundamentado na experiência e nos resultados experimentais obtidos ao longo dos últimos anos através de uma técnica de PCR Convencional (*nested* PCR) aplicada à deteção precoce da infeção VIH em crianças nascidas de mães infetadas.

Em estudos de avaliação da técnica de PCR Convencional, realizados no Laboratório Nacional de Referência VIH, aquando da sua implementação, observou-se que esta apresentava um bom desempenho na deteção do VIH-1, nomeadamente para a maioria dos subtipos de VIH-1 já identificados na população residente em Portugal. Estes estudos revelaram também que esta técnica, tendo por base a amplificação das regiões *alvo*, LTR e *pol*, apresentava uma especificidade e uma sensibilidade próximas dos 100%.

Desta forma, as potenciais regiões genómicas do HIV-1 a amplificar assim como alguns *primers* utilizados em *nested* PCR foram selecionados para o desenvolvimento da nova técnica de PCR em Tempo Real, que se pretende implementar no presente estudo.

Neste contexto, diferentes ensaios experimentais foram desenvolvidos para a amplificação de fragmentos de VIH-1 (região LTR e *pol*) e uma avaliação prévia de resultados foi efetuada tendo por base a utilização de grupos de amostras de referência (Figura 3.1).

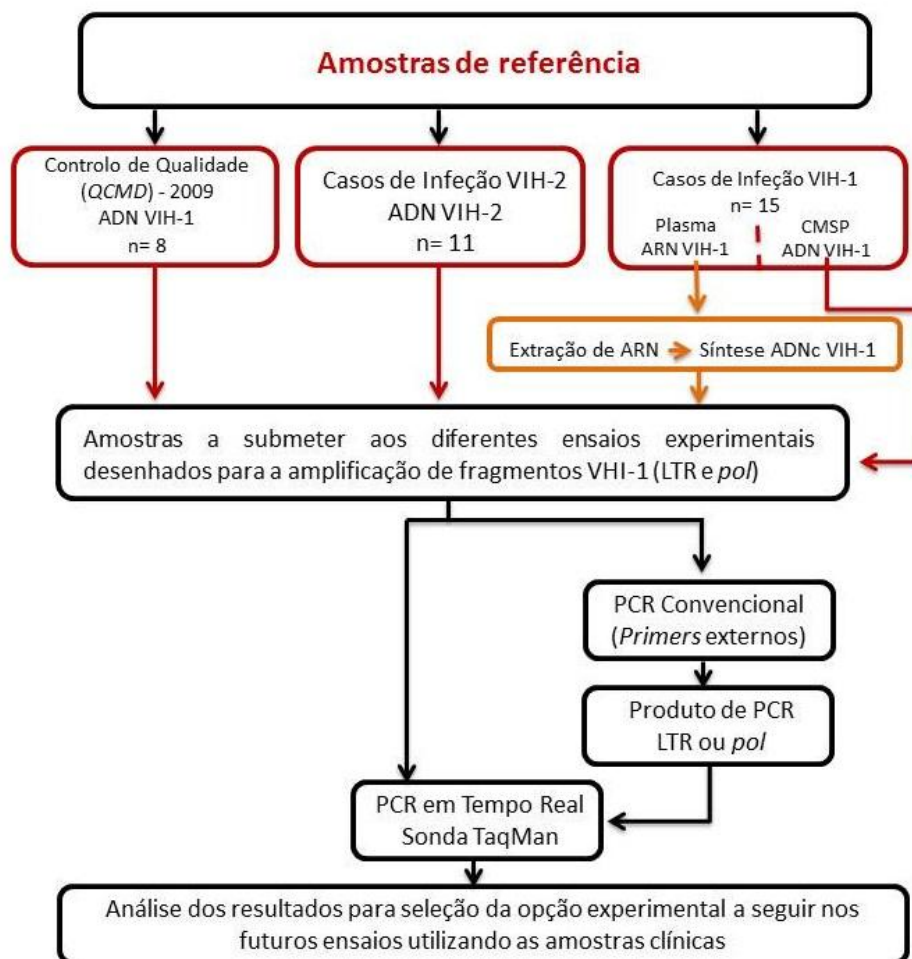


Figura 3.1 – Diagrama de trabalho baseado nos ensaios experimentais desenvolvidos no presente estudo com a utilização de amostras de referência.

3. Material e Métodos

O algoritmo experimental que apresentou melhor desempenho foi selecionado para o estudo de um conjunto de amostras clínicas, que correspondem a casos incluídos em protocolos de estudo da transmissão vertical mãe-filho do VIH-1, cujas amostras estavam disponíveis e foram recebidas no laboratório entre 2009-2011 (Figura 3.2).

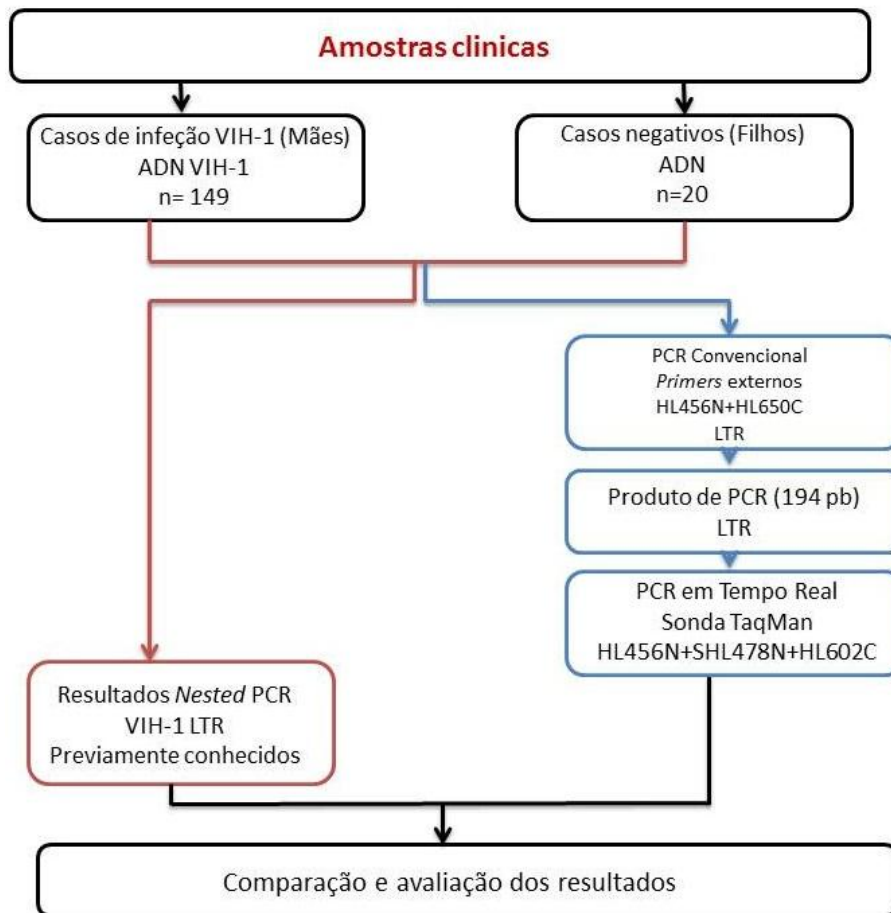


Figura 3.2 – Algoritmo experimental selecionado no presente estudo para o ensaio de amostras clínicas.

3.2 Primers e Sondas

Diferentes *primers* e sondas foram utilizados nas várias abordagens experimentais desenhadas para a amplificação de fragmentos da região LTR e *pol* VIH-1, pela técnica de PCR em Tempo Real.

As sondas utilizadas neste trabalho são do tipo TaqMan marcadas na região 5' com FAM (*reporter*) e na região 3' com TAMRA (*quencher*).

Na Tabela 3.1 constam as sequências dos *primers* e/ou sondas utilizados neste estudo. A potencial capacidade de hibridação dos *primers* e das sondas com sequências virais para os subtipos de VIH-1 mais frequentemente descritos em Portugal, foi analisada através do programa *QuickAlign* disponível no site http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK_ALIGN/QuickAlign.html.

3. Material e Métodos

Tabela 3.1 – *Primers* e/ou sondas utilizadas no presente estudo com indicação da respectiva sequência e localização no genoma do VIH-1.

Região	Nome	Sequência 5'-3'	Localização
LTR VIH-1	HL456N ⁽¹⁾	GTCTCTCTNGYTAGACCA	456 → 473
	HL478N ⁽²⁾	TAGGCCTGGGAGCTCTCTGGCT	478 → 499
	SHL478N ⁽³⁾	TAGGCCTGGGAGCTCTCTGGCT	478 → 499
	HL602C ⁽⁴⁾	CTGAGGGATCTCTAGWRACCAGA	580 ← 605
	HL650C ⁽⁵⁾	CCTGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGATTTT	622 ← 650
pol VIH-1	HP3543N ⁽⁶⁾	C <u>AR</u> GGG <u>CH</u> AAG <u>RC</u> CARTGGACAT	3543 → 3564
	HP3601N ⁽⁷⁾	CAGGAA <u>ART</u> TATGCA <u>AR</u> AA	3601 → 3618
	SHP3601N ⁽⁸⁾	CAGGAA <u>ART</u> TATGCA <u>AR</u> AA	3601 → 3618
	SHP3679N ⁽⁹⁾	CAGARAGCATARTRATAT	3679 → 3696
	HP3744C ⁽¹⁰⁾	CCCATGTTTCY <u>TTTY</u> G <u>KA</u>	3727 ← 3744
	HP3794C ⁽¹¹⁾	CTCCC <u>ANT</u> CAGGAATCCAG	3776 ← 3794
	SHP3794C ⁽¹²⁾	CTCCC <u>ANT</u> CAGGAATCCAG	3776 ← 3794
	HP3814C ⁽¹³⁾	GRTACCAYAATTTYACTA	3814 ← 3831

Legenda:

- (1) *Primer* HL456N desenhado *de novo* para este trabalho.
- (2) *Primer* HL478N descrito por Berry *et al*, 1998.
- (3) Sonda SHL478N a partir do *primer* descrito por Berry *et al*, 1998.
- (4) *Primer* HL602C alterado a partir do descrito por Berry *et al*, 1998, com a eliminação dos dois últimos nucleótidos.
- (5) *Primer* HL650C descrito por Berry *et al*, 1998.
- (6) *Primer* HP3543N alterado a partir do HP3541N descrito por Semple *et al*, 1991, com a eliminação do primeiro nucleótido e substituição por bases degeneradas de quatro nucleótidos, respetivamente na posição 3, 8, 11 e 15 (em sublinhado).
- (7) *Primer* HL3601N alterado a partir do HP3600N descrito por Semple *et al*, 1991, com a eliminação dos últimos 5 nucleótidos e substituição por bases degeneradas de dois deles, respetivamente nas posições 8 e 16 (em sublinhado).
- (8) Sonda SHP3601N tendo por base a sequência do *primer* descrito em (8).
- (9) Sonda SHP3679N desenhada *de novo* para este trabalho.
- (10) *Primer* HP3744C alterado a partir do HPOL2 descrito por Semple *et al*, 1991, com a eliminação dos últimos 5 nucleótidos e substituição por bases degeneradas de três nucleótidos, respetivamente nas posições 11, 15 e 17 (em sublinhado).
- (11) *Primer* HP3794C alterado a partir do HPMH6 descrito por Semple *et al*, 1991, com a eliminação dos últimos 5 nucleótidos e substituição por uma base degenerada na posição 7 (em sublinhado).
- (12) Sonda SHP3794C a partir do *primer* descrito em (12).
- (13) *Primer* HP3814C desenhado *de novo* para este trabalho.

3.3 Ensaios Experimentais Desenvolvidos

No presente estudo foram testados quatro ensaios experimentais, com a combinação de diferentes conjuntos de *primers*, tendo em atenção que se pretendia implementar uma reação de PCR em Tempo Real com o uso de uma sonda do tipo TaqMan (marcada com FAM e com TAMRA, respetivamente em 5' e 3'), que foram desenhadas para se ligar, respetivamente, à região LTR ou *pol* do VIH-1.

3. Material e Métodos

Assim, os vários ensaios experimentais (A, B, C, e D) consistiram nas seguintes combinações de *primers* e sondas:

- A. HL456N+SHL478N+HL602C
- B. HP3543N+SHP3601N+HP3744C
- C. HP3543N+SHP3679N+HP3744C
- D. HP3601N+SHP3794C+HP3814C

Todos os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados em paralelo, partindo de amostras de ADN VIH-1, extraídas de CMSP ou sintetizadas a partir de ARN, e de amostras previamente submetidas a amplificação por PCR Convencional antes da sua utilização nos ensaios experimentais. Os amplificados foram designados de produto de PCR no sentido de facilitar a diferenciação entre amostras.

Foram amplificados fragmentos da região LTR ou da região *pol* do VIH-1 de acordo com cada um dos ensaios experimentais de PCR em Tempo Real escolhidos (A, B, C, D). Os *primers* utilizados no PCR Convencional nos ensaios experimentais estão representados na tabela abaixo (Tabela 3.2).

Para melhor perceção do esquema de atuação dos *primers* e das sondas nos produtos gerados foram desenhados os diagramas apresentados nas figuras 3.3 e 3.4, respetivamente, para a região LTR e para a região *pol*.

Tabela 3.2 – *Primers* utilizados em PCR Convencional para gerar os produtos de PCR posteriormente utilizados nos ensaios experimentais de PCR em Tempo Real, com indicação do tamanho dos fragmentos obtidos em cada amplificação.

<i>Primers</i> de PCR Convencional	Tamanho do fragmento gerado (Pares de bases)	Ensaio experimental de PCR em Tempo Real	Tamanho do fragmento final gerado (Pares de bases)
HL456N+HL650C	194	A	146
HP3543N+HP3794C	251	B	201
HP3543N+HP3794C	251	C	201
HP3543N+HP3814C	271	D	213

3. Material e Métodos

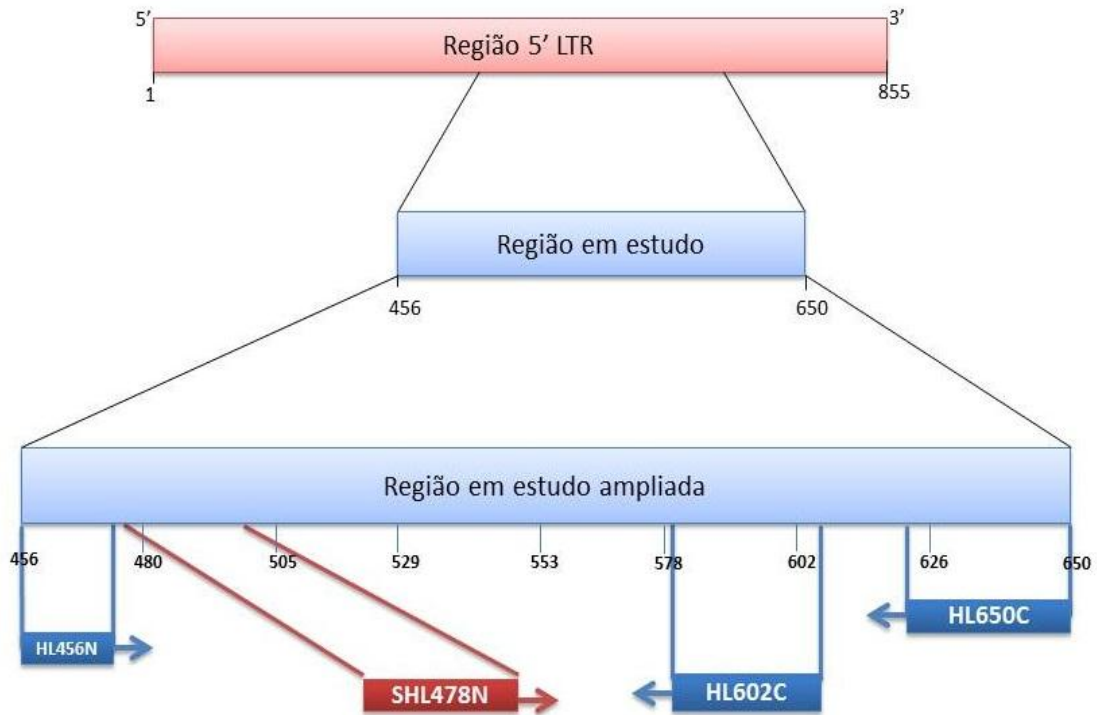


Figura 3.3 – Representação esquemática da localização e direção dos *primers* e sondas, bem como o tamanho dos fragmentos esperados, para a região LTR do VIH-1 (Ensaio experimental A).

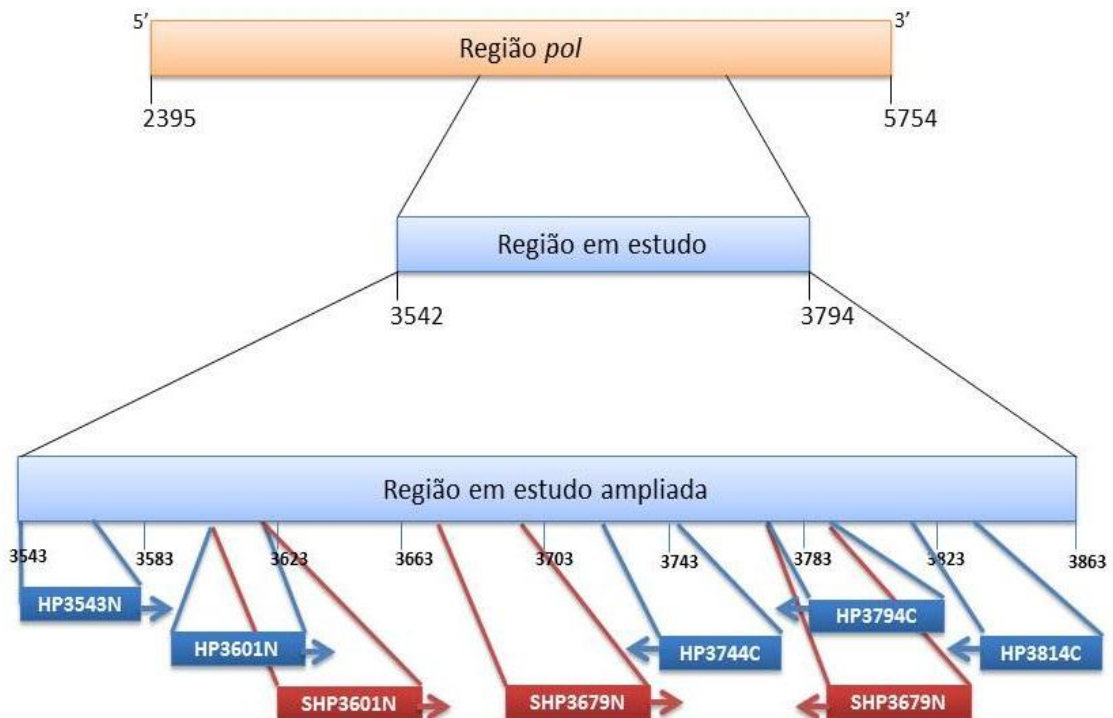


Figura 3.4 – Representação esquemática da localização e direção dos *primers* e sondas, bem como o tamanho dos fragmentos esperados, para a região *pol* do VIH-1 (Ensaios experimentais B, C e D).

3. Material e Métodos

3.4 Amostras de Referência

3.4.1 Amostras de ADN incluídas em Programa de Controlo de Qualidade

O Laboratório Nacional de Referência VIH participa anualmente num programa de controlo de qualidade para o diagnóstico molecular do VIH-1 (*QCMD, Quality Control for Molecular Diagnostics*) o qual integra 8 amostras quantificadas de ADN de VIH-1 que foi extraído a partir de CMSP. Amostras correspondentes ao programa *QCMD* de 2009 estavam disponíveis no laboratório para poderem ser utilizadas no presente estudo (Tabela 3.3). Estas amostras foram submetidas aos ensaios experimentais desenhados no sentido de poder ser efetuada uma prévia avaliação de resultados e, a respetiva seleção do algoritmo laboratorial a ser posteriormente utilizado em ensaios com amostras clínicas.

Tabela 3.3 – Caracterização de amostras incluídas no programa *QCMD* de 2009.

Referência	Tipo de amostra	Concentração (cópias/amostra)	Resultado esperado
HIVDNA09-01	VIH-1 ADN negativo	0	Negativo
HIVDNA09-02	VIH-1 ADN	20	Positivo forte
HIVDNA09-03	VIH-1 ADN negativo	0	Negativo
HIVDNA09-04	VIH-1 ADN	100	Positivo forte
HIVDNA09-05	VIH-1 ADN	500	Positivo forte
HIVDNA09-06	VIH-1 ADN	0.8	Positivo fraco
HIVDNA09-07	VIH-1 ADN	0.16	Positivo fraco
HIVDNA09-08	VIH-1 ADN	4	Positivo

3.4.2 Amostras ADN VIH-1 Positivas

Adicionalmente às amostras de ADN quantificado do programa *QCMD* 2009, foram utilizadas na prévia avaliação dos ensaios experimentais desenvolvidos dois outros tipos de amostras biológicas, respetivamente derivadas de plasma e de CMSP, e que foram selecionadas de 15 indivíduos infetados por VIH-1 dos quais 14 casos estavam sob terapêutica anti-retrovírica. Em todos os casos foi confirmada clínica e laboratorialmente a infeção por VIH-1.

a) Amostras de ADN obtidas a partir de CMSP

As 15 amostras de ADN VIH-1 utilizadas foram obtidas a partir de CMSP separadas em gradiente de *Ficoll-Paque* a partir de sangue colhido em tubo com anticoagulante (EDTA).

Este grupo de amostras, disponíveis no laboratório para o presente estudo, foram colhidas a indivíduos infetados por VIH-1 do sexo feminino, com média de idade de 32,6 anos (variando entre 19 e 41 anos). De um total de 14 casos, 8 (53%) tinham naturalidade portuguesa, 5 (34%) eram oriundas de países africanos e 1 (7%) era da República Dominicana.

3. Material e Métodos

Todas as amostras de ADN apresentavam resultados positivos pela técnica de *nested* PCR utilizada no laboratório para diagnóstico precoce da infeção VIH-1.

b) Amostras de ADN complementar obtidas a partir de ARN viral extraído do plasma

Foram utilizadas 15 amostras de ADNc, obtidas a partir do ARN viral extraído de amostras de plasma do mesmo grupo de indivíduos acima descrito. Em 12 das 15 amostras utilizadas, o valor de ARN VIH-1 no plasma, quantificado na altura da colheita, encontrava-se abaixo do limiar de deteção da técnica (<50 cópias/mm³), 2 amostras apresentavam, respetivamente, os valores de 367 e 412 cópias/mm³ e em 1 caso o valor de ARN VIH-1 não era conhecido.

3.4.3 Amostras de ADN VIH-2 Positivas

Ainda para complementar a prévia avaliação dos ensaios experimentais desenvolvidos de PCR em Tempo Real, foram utilizadas 11 amostras de ADN VIH-2 positivas obtidas de indivíduos cuja infeção foi clínica e laboratorialmente confirmada. Todas estas amostras eram negativas para a infeção por VIH-1.

3.5 Amostras Clínicas

Após a realização dos ensaios experimentais com as amostras de referência, e em função dos resultados obtidos, foi selecionado o algoritmo laboratorial adequado para testar o grupo de amostras clínicas. Este grupo inclui amostras cujo ADN foi obtido de mães infetadas por VIH-1 e também amostras de ADN obtido de crianças nascidas de mães infetadas, em que não ocorreu transmissão vertical do vírus.

3.5.1 Amostras de Mães Infetadas por VIH-1

No contexto do estudo da transmissão da mãe ao filho, um grupo de 149 amostras colhidas a 128 mães infetadas por VIH-1 foram disponibilizadas para o presente trabalho. Do total de 149 amostras analisadas, 128 correspondem a uma primeira colheita efetuada em média cerca de 24 horas após o parto, e 21 correspondem a uma segunda colheita efetuada cerca de 2 meses após o parto. De salientar que tecnicamente a deteção de VIH-1 nestas duas colheitas seriadas no tempo pode ser influenciada pela diferente pressão terapêutica. Contrariamente às condições da segunda colheita, na primeira colheita existe uma forte influência dos anti-retrovíricos que são ministrados na gravidez e no parto como medida de prevenção da transmissão da mãe ao filho do VIH-1.

A idade média das mães na altura da colheita foi de 30 anos. A maioria era de naturalidade portuguesa (52%). No entanto, 34% era oriunda de países africanos, 3% de outros países europeus, 6% de naturalidade brasileira e 1% indiana. Em 4% das mães não se encontrava disponível a informação sobre a sua naturalidade.

Em 122 dos 128 casos foi possível conhecer informação sobre a vigilância da gravidez. Em 107 (88%) casos a vigilância clínica e laboratorial foi efetuada regularmente durante a gravidez, enquanto nos restantes 15 (11%) casos a gravidez não foi vigiada.

3. Material e Métodos

Em 127 de 128 casos foi possível conhecer informação sobre terapêutica anti-retrovírica (TAR) de prevenção da transmissão vertical, sendo que em 114 (90%) casos existiu cumprimento do regime TAR preconizado durante a gravidez. Em 13 (10%) casos não houve cumprimento de TAR como medida de prevenção da transmissão VIH-1 da mãe ao filho.

Os valores de ARN VIH-1 quantificados no plasma próximos à data do parto eram conhecidos para 107 de 128 casos analisados, apresentando uma média de 3618 cópias/mm³ (8 133 cópias/mm³ para as não cumpridoras de TAR e 3 350 cópias/mm³ para as cumpridoras de TAR).

Em 68 (64%) casos, os valores de carga viral VIH-1 estavam abaixo de 50 cópias/mm³ (indetectáveis). Para os restantes casos, 20 (19%) casos apresentavam valores entre 51 e 1000 cópias/mm³, 9 (8%) casos entre 1000 e 10 mil cópias/mm³ e 10 (9%) casos apresentavam elevados valores de carga viral VIH-1 superiores a 10 mil cópias/mm³.

3.5.2 Amostras de Filhos Nascidos de Mães Infetadas por VIH-1

Foram também estudadas 20 amostras de ADN obtidas a partir de crianças nascidas de mães infetadas por VIH-1 mas em que não ocorreu a transmissão do vírus.

Este grupo de amostras corresponde a filhos de 19 mães com uma média de idade de 25 anos, em que 8 (42%) têm naturalidade portuguesa, 8 (42%) eram oriundas de países africanos e 2 (10%) de países europeus. A naturalidade era desconhecida para o restante caso. Apenas 3 crianças do grupo analisado nasceram de mães em que não existiu cumprimento da TAR de prevenção. Contudo os valores médios quantificados de ARN VIH-1, para 17 das 19 mães à data do parto, eram de 12 127 cópias/mm³ (8 555 cópias/mm³ para as cumpridoras de TAR e de 25 711 cópias/mm³ para as não cumpridoras de TAR).

Em 8 (42%) casos, os valores de carga viral VIH-1 estavam abaixo de 50 cópias/mm³ (indetectáveis). Dos restantes casos, 2 (11%) apresentavam valores entre 51 e 1000 cópias/mm³, 2 (11%) casos entre 1000 e 10 mil cópias/mm³ e 5 (26%) dos casos apresentavam uma carga viral VIH-1 acima das 10 mil cópias/mm³. Em 2 (11%) dos casos o valor era desconhecido.

3.6 Preparação das Amostras

3.6.1 Separação de CMSP e Extração e Purificação do ADN

As amostras de ADN utilizadas no presente trabalho encontravam-se armazenadas a -80°C e derivaram de CMSP isolados de sangue colhido a cada indivíduo que foi incluído no estudo.

As CMSP são isoladas através de um gradiente de densidade gerado pelo reagente *Ficoll-Paque™ Plus* (GE Healthcare Ltd, England) após centrifugação. A extração e purificação do ADN foi feita em coluna de forma semiautomática com a utilização do equipamento *QIAcube* e de reagentes incluídos no kit *QIAGEN QIAamp® DNA Blood* (Quiagen®, USA) seguindo as instruções do fabricante.

3. Material e Métodos

3.6.2 Extração de ARN a partir do Plasma

A extração do ARN viral a partir do plasma foi efetuada com o *kit* comercial *QIAmp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)*, seguindo as instruções do fabricante. O passo inicial consistiu na lise das partículas virais através da adição de um tampão apropriado contendo ARN *carrier*. A mistura é depois homogeneizada e incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos, após o qual é adicionado etanol a 96%.

Uma parte do volume da mistura é transferida para uma coluna, seguindo-se uma centrifugação à velocidade máxima (10 000 rpm/min). Este passo é repetido duas vezes até toda a mistura ter passado a membrana da coluna.

Por último, o ARN foi lavado através da utilização de duas soluções de lavagem e eluído com um tampão de eluição, obtendo-se assim ARN viral purificado que foi guardado a -80°C até à sua utilização.

3.6.3 Síntese de ADN complementar

A síntese de ADNc foi realizada através do *kit* comercial *RT – Kit plus (Nanogen Advanced Diagnostics S.r.L., Italy)*, seguindo as instruções do fabricante.

Para a síntese é necessária a preparação de uma mistura de reação por cada amostra de ARN, que contém transcriptase reversa, um inibidor de RNase e água pura. Esta mistura foi adicionada ao conteúdo dos tubos *RT-MIX monotest tubes* incluídos no kit, onde foi também posteriormente adicionado o ARN extraído.

A síntese do ADNc ocorreu num termociclador de acordo com o seguinte programa: 25°C durante 10 minutos; 37°C durante 45 minutos; 95°C durante 5 minutos.

3.7 Reação de Amplificação de Ácidos Nucleicos

3.7.1 Reação de PCR Convencional

Para a reação de amplificação por PCR convencional a partir de amostras de ADN e ADNc foi utilizado o sistema *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, England)*. Cada tubo possui uma esfera liofilizada constituída por dNTPs a 200 µM, Tris HCL a 10 mM, KCl a 50 mM e MgCl₂ a 1,5 mM à qual é adicionado 1 µl de cada *primer* a uma concentração de 5 µM, 5 µl de ADN e água até completar o volume final de 25 µl. O programa de amplificação usado com este sistema está descrito na tabela 3.4.

Nesta mistura de reação de PCR convencional para a amplificação de um fragmento genómico do VIH-1, os *primers* utilizados foram os designados de externos, nomeadamente o HL456N e o HL650C para a região LTR (ensaio experimental A) e o HP3543N e o HP3794C (ensaio experimental B e C) ou o HP3814C (ensaio experimental D) para a região *pol* do VIH-1.

Em alternativa ao sistema de amplificação anteriormente descrito, foi também utilizada a enzima *AmpliTaq® Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA)*. A mistura de reação foi efetuada com 5 µl de tampão de PCR designado *GeneAmp 10x PCR Gold Buffer*, 3 µl de MgCl₂ a 25 mM, 8 µl de dNTPs a 1,25 mM, 2 µl de cada um dos *primers* a 5 µM e 0,25 µl da enzima *AmpliTaq® Gold* a 5U/µl. A esta mistura foi adicionada água até perfazer o volume de

3. Material e Métodos

45 µl. O volume final de 50 µl foi perfeito com 5 µl de ADN ou ADNc. O programa de amplificação deste sistema alternativo está descrito na tabela 3.5.

Tabela 3.4 – Programa de amplificação por PCR Convencional para amostras de ADN e ADNc utilizando o sistema *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads*.

Fases	Temperatura	Tempo de duração	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	9 Min	1
Desnaturação	95°C	30 Seg	
Hibridação	50°C	1 Min	35
Síntese	72°C	1 Min	
Extensão Final	72°C	7 Min	1

Tabela 3.5 – Programa de amplificação por PCR convencional para amostras de ADN e ADNc utilizando *AmpliTaq® Gold*.

Fases	Temperatura	Tempo de duração	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	9 Min	1
Desnaturação	95°C	30 Seg	
Hibridação	50°C	1 Min	35
Síntese	72°C	1 Min	
Extensão Final	72°C	7 Min	1

De modo a evitar possíveis contaminações durante as reações de amplificação, a preparação da mistura de reação e a adição de amostras foram realizadas em salas diferentes e fluxos unidirecionais de trabalho. Foram também utilizados controlos positivos da reação e controlos negativos em que nestes últimos as amostras de ADN ou ADNc foram substituídas por alíquotas de água pura.

3.7.2 Reação de PCR em Tempo Real

Para a reação de amplificação em Tempo Real foi utilizado o *SensiMix™ Probe Kit* (*Bioline Ltd, United Kingdom*) de acordo com as instruções do fabricante e usando o equipamento *Rotorgene™ 3000* (*Corbett Research*). Para um volume final de 25 µl foram utilizados 12,5 µl de 2x *SensiMix™*, 2 µl de cada *primer* a 5 µM, 1 µl da Sonda TaqMan a 200 nM. Neste caso foram utilizados entre 2-5 µl de ADN ou ADN complementar ou produto de PCR consoante o ensaio a efetuar. Perfez-se o volume final de 25 µl ao adicionar a quantidade necessária de água.

As combinações de *primers* e respetivas sondas utilizadas nos vários ensaios experimentais estão descritos no ponto 1.3 desta seção e o programa de amplificação para PCR em Tempo Real encontra-se descrito na tabela 3.6.

3. Material e Métodos

Tabela 3.6 – Programa de amplificação por PCR em Tempo Real a partir de amostras de ADN ou de produtos previamente amplificados por PCR Convencional utilizando os *primers* e a sonda adequada para amplificação da região LTR ou *pol* do VIH-1.

Fases	Temperatura	Tempo de duração	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	10 Min	1
Desnaturação	95°C	10 Seg	40
Hibridação	50°C	1 Min	

De modo a evitar possíveis contaminações durante as reações de amplificação, a preparação da mistura de reação e a adição dos diferentes tipos de amostras (ADN/ADNc/produto de PCR) foram realizadas em salas diferentes e com fluxos unidirecionais de trabalho. Foram também utilizados controlos positivos da reação e controlos negativos em que os diferentes tipos de amostras foram substituídos por alíquotas de água pura.

A análise dos resultados dos ensaios de PCR em Tempo Real foi efetuada de acordo com a interpretação dos gráficos obtidos com base nos valores de fluorescência detetados automaticamente pelo equipamento e usando o programa informático recomendado pelo fabricante (*Corbett Rotor-Gene 3000 Application Software, version 6.1.93*).

3.8 Análise Estatística

Para a análise de concordância dos resultados foi aplicado o coeficiente de *Kappa* (*Cohen*) e o teste de *McNemar* através do programa *Statistical Package for Social Studies*, versão 17.0 (*SPSS Inc., USA*). Este programa permitiu também calcular a especificidade e sensibilidade da técnica de PCR em Tempo Real e posterior comparação dos resultados com a técnica de PCR Convencional (*nested PCR*).

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Avaliação de Resultados Obtidos nos Ensaios com Amostras de Referência

A. Amostras submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A

O ensaio experimental de PCR em Tempo Real denominado A foi realizado com a utilização dos *primers* HL456N e HL602C e a sonda SHL478N desenhados na região LTR do VIH-1. Neste ensaio foram diretamente submetidas as amostras de ADN extraídas de CMSP e amostras de ADN complementar sintetizado a partir de ARN extraído de plasma de casos VIH-1 positivos. No entanto, estas mesmas amostras foram também submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A após uma amplificação prévia do ADN (obtido de CMSP e de ARN) por uma reação de PCR Convencional onde foram utilizados os *primers* externos HL456N e HL650C, que potencialmente geravam um fragmento de ADN de 194 pares de bases na região LTR do VIH-1. Em todas as reações foram adicionados controlos negativos e positivos para o VIH-1 para controlo da reação de amplificação e validação dos ensaios.

A1) Amostras do programa QCMD 2009

Na comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados, observou-se que quando o ensaio foi efetuado a partir de ADN de CMSP não ocorreu amplificação em 5 dos 6 casos em que se esperava um resultado positivo. Apenas foi possível observar 1 amostra (HIVDNA09-05) com resultado positivo. Esta amostra de referência correspondia aquela que apresentava maior número de cópias de ADN proviral (500 cópias/amostra). Nesta abordagem experimental foi observada uma reduzida sensibilidade do ensaio (16,7%).

Em contrapartida, analisando os resultados do mesmo ensaio efetuado a partir das amostras submetidas a uma prévia amplificação por PCR convencional (a que designaremos futuramente por produtos de PCR) já foi possível observar amplificação em 5 dos 6 casos. Apenas numa amostra positiva (HIVDNA09-07) não foi obtida amplificação do VIH-1. Contudo, esta amostra correspondia aquela com o mais reduzido número de cópias de ADN viral (0,16 cópias/amostra) do conjunto das amostras positivas testado (Tabelas 4.1 e 4.2). Foi observado neste ensaio uma sensibilidade de 83,3% e um limite de deteção de 0,8 cópias/amostra.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos com as amostras do programa QCMD de 2009, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras de Referência	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real	
		Resultados do Ensaio experimental A HL456N+SHL478N+HL602C	
QCMD 2009	P/N	ADN*	Produto de PCR**
HIVDNA09-01	N	N	N
HIVDNA09-02	P	N	P
HIVDNA09-03	N	N	N
HIVDNA09-04	P	N	P
HIVDNA09-05	P	P	P
HIVDNA09-06	P	N	P
HIVDNA09-07	P	N	N
HIVDNA09-08	P	N	P

4. Resultados

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; * Amostra de ADN obtida a partir de CMSP de casos VIH-1 positivos e negativos; ** Amostra submetida a prévia amplificação com a utilização dos *primers* HL456N+HL650C numa reação de PCR Convencional para obtenção de um fragmento de ADN de 194 pares de bases da região LTR do VIH-1.

Tabela 4.2 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real para as amostras incluídas no programa *QCMD* de 2009, testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real A			
Resultados esperados	Resultados obtidos		
	Amostras de ADN <i>QCMD</i> 2009		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro negativo	2	0	2
Verdadeiro positivo	5	1	6
Produtos de PCR de amostras ADN <i>QCMD</i> 2009			
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro negativo	2	0	2
Verdadeiro positivo	1	5	6

A2) Amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP

Na comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados observou-se que a partir de ADN ocorreu amplificação em 6 do total de 15 amostras positivas analisadas. Não foi possível observar a amplificação em 9 amostras. A sensibilidade do ensaio para o conjunto de amostras positivas foi de 40%

No entanto, ao analisar os resultados do ensaio efetuado a partir de amostras submetidas a uma prévia amplificação por reação de PCR Convencional, produto de PCR, foi possível observar que 13 dos 15 casos revelaram resultado positivo. Apenas em duas amostras positivas não foi obtida amplificação do VIH-1 (Tabelas 4.3 e 4.4). Nestas condições, a sensibilidade obtida no ensaio foi de 86,7%.

4. Resultados

Tabela 4.3 – Resultados obtidos com as amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras ADN Casos VIH-1 positivos	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real Resultados do Ensaio experimental A HL456N+SHL478N+HL602C	
		ADN*	Produto de PCR**
ADN – 01	P	N	N
ADN – 02	P	P	P
ADN – 03	P	N	P
ADN – 04	P	N	P
ADN – 05	P	N	P
ADN – 06	P	N	N
ADN – 07	P	N	P
ADN – 08	P	P	P
ADN – 09	P	P	P
ADN – 10	P	P	P
ADN – 11	P	N	P
ADN – 12	P	N	P
ADN – 13	P	P	P
ADN – 14	P	P	P
ADN – 15	P	N	P

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; * Amostra de ADN obtida a partir de CMSP de casos VIH-1 positivos; ** Amostra previamente submetida a amplificação numa reação de PCR Convencional com a utilização dos *primers* HL456N+HL650C e que potencialmente correspondente a um fragmento de 194 pares de bases da região LTR do VIH-1

Tabela 4.4 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real para as amostras ADN VIH-1 positivas testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real A			
Resultados esperados	Resultados obtidos Amostras de ADN VIH-1 positivas		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	9	6	15
Produtos de PCR de amostras ADN VIH-1 positivo			
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	2	13	15

A3) Amostras de ADNc obtidas a partir de ARN VIH-1 extraído do plasma

Para o mesmo conjunto de amostras de ADN testadas em A2) encontravam-se disponíveis amostras de plasma, a partir das quais foi extraído ARN e posteriormente sintetizado o ADNc. Ao analisar os resultados destas amostras no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, em que as amostras foram submetidas quer na forma de ADNc, quer na

4. Resultados

forma de produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional, não foi observada amplificação em nenhum dos 15 casos positivos analisados (Tabela 4.5). No entanto, em todos os controlos positivos VIH-1 adicionados nos vários ensaios experimentais foi observado sinal de amplificação.

Nestes 15 casos, 12 casos apresentavam valores de carga viral (ARN VIH-1) abaixo de 50 cópias/mm³, 1 caso apresentava um valor de 367 cópias/mm³ e outro caso um valor de 412 cópias/mm³. Em 1 caso estudado esta informação não se encontrava disponível.

Tabela 4.5 – Resultados obtidos com as amostras de ADN complementar de casos de infeção VIH-1 obtidas a partir de ARN viral extraído do plasma, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, na forma de ADN complementar e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras ADNc Casos VIH-1 Positivos	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real Resultados do Ensaio experimental A HL456N+SHL478N+HL602C	
		P/N	ADNc*
ADNc – 01	P	N	N
ADNc – 02	P	N	N
ADNc – 03	P	N	N
ADNc – 04	P	N	N
ADNc – 05	P	N	N
ADNc – 06	P	N	N
ADNc – 07	P	N	N
ADNc – 08	P	N	N
ADNc - 09	P	N	N
ADNc – 10	P	N	N
ADNc – 11	P	N	N
ADNc – 12	P	N	N
ADNc – 13	P	N	N
ADNc – 14	P	N	N
ADNc – 15	P	N	N

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; *Amostra obtida a partir de extração de ARN VIH-1 do plasma e posterior síntese de ADNc em casos VIH-1 positivos;** Amostra submetida a prévia amplificação em reação de PCR Convencional com a utilização dos *primers* HL456N+HL650C para obtenção de um fragmento de ADN de 194 pares de bases da região LTR do VIH-1.

A4) Amostras ADN VIH-2 positivas

Na comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados, observou-se uma total concordância de resultados. Não foi observada amplificação em nenhum dos 11 casos positivos para VIH-2 (negativos para VIH-1) testados, quer quando as amostras foram submetidas na forma de ADN quer na forma de produto resultante da prévia amplificação por PCR Convencional (Tabela 4.6). Para todos os controlos positivos VIH-1 utilizados no ensaio foi observado sinal de amplificação. A especificidade complementar do ensaio experimental de PCR em Tempo Real A foi de 100%.

4. Resultados

Tabela 4.6 – Resultados obtidos com as amostras de ADN VIH-2 positivas quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras ADN VIH-2 positivas	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real Resultados do Ensaio experimental A HL456N+SHL478N+HL602C	
		P/N	ADN*
VIH2 – 01	N	N	N
VIH2 – 02	N	N	N
VIH2 – 03	N	N	N
VIH2 – 04	N	N	N
VIH2 – 05	N	N	N
VIH2 – 06	N	N	N
VIH2 – 07	N	N	N
VIH2 – 08	N	N	N
VIH2 – 09	N	N	N
VIH2 – 10	N	N	N
VIH2 – 11	N	N	N

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; *Amostra de ADN extraída de casos de infeção VIH-2 positiva (e VIH-1 negativa);**Amostra previamente submetidas a reação de PCR Convencional com a utilização dos *primers* HL456N+HL650C que potencialmente geram um fragmento de 194 pares de bases da região LTR do VIH-1.

B. Amostras submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B

Seguindo o desenho do ensaio experimental descrito anteriormente que tinha como alvo a amplificação da região LTR do VIH-1, foi desenvolvido nos mesmos moldes, o ensaio experimental de PCR em Tempo Real designado B mas utilizando os *primers* HP3543N e HP3744C e a sonda SPH3601N desenhados na região *pol* do VIH-1. Também neste ensaio foram diretamente submetidas amostras de ADN (extraídas de CMSP), e indiretamente produtos resultantes da sua amplificação prévia por reação de PCR Convencional. Nesta etapa foram utilizados os *primers* externos HP3543N e HP3794C, que potencialmente geravam fragmentos de ADN de 251 pares de bases na região *pol* do VIH-1 e que posteriormente foram submetidos ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B. Controlos positivos e negativos foram adicionados aos diferentes ensaios para validação dos testes.

B1) Amostras do programa QCMD 2009

Ao comparar os resultados obtidos com os resultados esperados, observou-se que não ocorreu amplificação em nenhum dos 6 casos positivos incluídos no programa de qualidade QCMD 2009, tanto partindo de amostras de ADN como de produto de PCR, e que foram submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B (Tabelas 4.7 e 4.8). No entanto, para todos os controlos positivos VIH-1 utilizados no ensaio foi observado sinal de amplificação.

4. Resultados

Tabela 4.7 - Resultados obtidos com as amostras do programa *QCMD* de 2009, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras de Referência	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real	
		Resultados do Ensaio experimental B HP3543N+SHP3601N+HP3744C	
QCMD 2009	P/N	ADN*	Produto de PCR**
HIVDNA09-01	N	N	N
HIVDNA09-02	P	N	N
HIVDNA09-03	N	N	N
HIVDNA09-04	P	N	N
HIVDNA09-05	P	N	N
HIVDNA09-06	P	N	N
HIVDNA09-07	P	N	N
HIVDNA09-08	P	N	N

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; * Amostra de ADN obtida a partir de CMSP de casos VIH-1 positivos e negativos; ** Amostra submetida a prévia amplificação com a utilização dos *primers* HP3543N+HP3794C uma reação de PCR Convencional para obtenção de um fragmento de ADN de 251 pares de bases da região *pol* do VIH-1.

Tabela 4.8 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real nas amostras incluídas no programa *QCMD* de 2009 testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real B.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real B			
Resultados esperados	Resultados obtidos		
	Amostras de ADN <i>QCMD</i> 2009		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro negativo	2	0	2
Verdadeiro positivo	6	0	6
Produtos de PCR de amostras ADN <i>QCMD</i> 2009			
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro negativo	2	0	2
Verdadeiro positivo	6	0	6

B2) Amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP

Na comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados verificou-se que não ocorreu amplificação em nenhuma das 15 amostras VIH-1 positivas quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B (Tabelas 4.9 e 4.10). No entanto, para todos os controlos positivos VIH-1 utilizados no ensaio foi observado sinal de amplificação.

4. Resultados

Tabela 4.9 – Resultados obtidos com as amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real B, na forma de ADN e na forma de potencial produto, resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras ADN VIH-1 positivas	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real	
		Resultados do Ensaio experimental B HP3543N+SHP3601N+HP3744C	
Obtidas a partir de CMSP	P/N	ADN*	Produto de PCR**
ADN – 01	P	N	N
ADN – 02	P	N	N
ADN – 03	P	N	N
ADN – 04	P	N	N
ADN – 05	P	N	N
ADN – 06	P	N	N
ADN – 07	P	N	N
ADN – 08	P	N	N
ADN – 09	P	N	N
ADN – 10	P	N	N
ADN – 11	P	N	N
ADN – 12	P	N	N
ADN – 13	P	N	N
ADN – 14	P	N	N
ADN – 15	P	N	N

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; * Amostra de ADN obtida a partir de CMSP de casos VIH-1 positivos; ** Amostra submetida a prévia amplificação com a utilização dos *primers* HP3543N+HP3794C numa reação de PCR Convencional para obtenção de um fragmento de ADN de 251 pares de bases da região *pol* do VIH-1.

Tabela 4.10 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real nas amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, testadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real B.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real B			
Resultados esperados	Resultados obtidos		
	Amostras de ADN VIH-1 positivas		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	15	0	15
Produtos de PCR de amostras ADN VIH-1 positivo			
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	15	0	15

C. Amostras submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real C

O ensaio experimental de PCR em Tempo Real designado de C foi realizado com a utilização dos *primers* HP3543N e HP3744C e a sonda SHP3679N desenhados na região *pol* do VIH-1. A diferença deste ensaio comparativamente ao ensaio B anteriormente descrito, residiu na utilização de uma nova sonda. No ensaio C, tal como nos anteriores, foram diretamente

4. Resultados

submetidas as amostras de ADN (extraídas de CMSP) e os potenciais produtos de PCR resultantes de amplificação prévia do ADN numa reação de PCR Convencional utilizando os *primers* externos, HP3543N e HP3794C, já descritos no ensaio experimental B.

C1) Amostras do programa QCMD 2009

Quando as amostras do programa QCMD 2009 foram diretamente submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real C, bem como indiretamente através dos seus produtos, obtiveram-se resultados idênticos aos descritos no ensaio experimental B, ou seja, não ocorreu amplificação em nenhum dos 6 casos de amostras VIH-1 positivas analisadas. Contudo, foi observada amplificação em todos os controlos positivos VIH-1 utilizados no ensaio.

C2) Amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP

Os resultados obtidos no ensaio experimental C para as 15 amostras VIH-1 positivas foram idênticos aos obtidos quando as mesmas amostras foram submetidas ao ensaio experimental B. Assim, não se verificou a existência de amplificação em nenhum dos casos positivos, embora contrariamente fosse observado sucesso de amplificação para os vários controlos positivos adicionados aquando da realização dos ensaios.

D. Amostras submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real D

Algumas alterações no desenho deste ensaio experimental de PCR em Tempo Real designado de D foram efetuadas comparativamente ao dos ensaios B e C descritos anteriormente. Essas alterações incluem a utilização dos *primers* HP3601N e HP3814C e a sonda SHP3794C desenhados na região *pol* do VIH-1 para a reação de PCR em Tempo Real e a utilização dos *primers* externos HP3543N e HP3814C para a amplificação prévia por PCR Convencional. Esta prévia amplificação gerava um potencial fragmento de 271 pares de bases na região *pol* do VIH-1.

D1) Amostras do programa QCMD 2009

No ensaio experimental de PCR em Tempo Real D obtiveram-se resultados idênticos aos descritos nos ensaios experimental B e C para as amostras do programa QCMD 2009, ou seja, não ocorreu amplificação em nenhum dos 6 casos positivos testados. Mais uma vez foi observada amplificação em todos os controlos positivos VIH-1 adicionados ao ensaio.

D2) Amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP

Na comparação dos resultados obtidos com os resultados esperados observou-se que a partir de amostras de ADN apenas ocorreu amplificação em 2 das 15 amostras positivas analisadas. Nos restantes 13 amostras não foi observada amplificação do VIH-1. Contudo, analisando os resultados do ensaio que foi efetuado a partir de amostras submetidas a prévia amplificação por PCR Convencional foi possível observar sinal de amplificação em mais dois

4. Resultados

casos. Nesta abordagem foram obtidos 4 resultados positivos entre os 15 esperados. Deste modo, neste ensaio experimental não ocorreu amplificação do VIH-1 em 11 casos positivos (Tabelas 4.11 e 4.12) mostrando ter uma reduzida sensibilidade (27%) na deteção para o VIH-1.

Tabela 4.11 – Resultados obtidos com as amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP, quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real D, na forma de ADN e na forma de potencial produto resultante de uma prévia amplificação por PCR Convencional.

Amostras ADN VIH-1 positivas	Resultado Esperado	PCR em Tempo Real	
		Resultados do Ensaio experimental D HP3601N+SHP3794C+H3814C	
	P/N	ADN*	Produto de PCR**
ADN – 01	P	N	N
ADN – 02	P	N	N
ADN – 03	P	N	N
ADN – 04	P	N	N
ADN – 05	P	N	N
ADN – 06	P	N	N
ADN – 07	P	N	N
ADN – 08	P	N	N
ADN – 09	P	N	N
ADN – 10	P	P	P
ADN – 11	P	N	N
ADN – 12	P	N	P
ADN – 13	P	N	P
ADN – 14	P	P	P
ADN – 15	P	N	N

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; * Amostra de ADN obtida a partir de CMSP de casos VIH-1 positivos; ** Amostra submetida a prévia amplificação com a utilização dos *primers* HP3543N+HP3814C numa reação de PCR Convencional para obtenção de um fragmento de ADN de 271 pares de bases da região *pol* do VIH-1.

Tabela 4.12 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos neste estudo por PCR em Tempo Real nas amostras ADN VIH-1 positivas obtidas a partir de CMSP testadas no ensaio experimental D.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real D			
Resultados esperados	Resultados obtidos		
	Amostras de ADN VIH-1 positivas		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	13	2	15
Produtos de PCR de amostras ADN VIH-1 positivo			
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	11	4	15

D3) Amostras de ADNc obtidas a partir de ARN VIH-1 extraído do plasma

Para este ensaio, ao comparar os resultados esperados com os obtidos verificou-se que não existiu amplificação em nenhum dos casos positivos, observou-se assim resultados idênticos aos obtidos para as amostras de ADNc quando submetidas ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real A.

4.2 Avaliação dos Resultados Obtidos com Amostras Clínicas

A escolha do modelo experimental a aplicar às amostras clínicas baseou-se nos resultados obtidos com as amostras de referência (ADN extraído de CMSP ou de ARN extraído do plasma) e produtos de PCR obtidos após uma reação de PCR convencional. Foi com os produtos de PCR gerados a partir de ADN de CSMP que se observou valores de sensibilidade mais elevados nos ensaios.

Assim, as amostras clínicas foram submetidas ao ensaio escolhido sob a forma de um potencial produto de PCR gerado a partir de uma prévia amplificação do ADN, utilizando os *primers* externos HL456N e HL650C que potencialmente geravam um fragmento de ADN de 194 pares de bases na região LTR do VIH-1. Por ter sido o ensaio que mostrou melhor desempenho em termos de resultados, estes produtos foram submetidos ao ensaio experimental de PCR em Tempo Real denominado A, que como já foi descrito anteriormente, utilizou os *primers* HL456N e HL602C e a sonda SHL478N correspondendo a uma potencial hibridação em sequências virais da região LTR do VIH-1.

Na comparação dos resultados esperados com os resultados obtidos, observou-se que existiu amplificação em 100 entre 128 amostras clínicas testadas. Das 100 amostras maternas, 50 apresentavam carga viral abaixo de 50 cópias/mm³ (indetetável), 5 casos apresentavam carga viral entre 51 e 100 cópias/mm³, 14 casos apresentavam valores entre 100 e 1000 cópias/mm³, 7 casos apresentavam valores entre 1000 e 10 000 cópias/mm³ e 10 casos apresentavam valores acima das 10 000 cópias/mm³. Em 14 dos 100 casos com amplificação VIH-1 a informação sobre o valor de carga viral na altura da colheita não estava disponível.

Nas condições selecionadas não foram amplificadas 28 amostras maternas. Nestas amostras verificou-se que em 18 casos a carga viral era indetetável (<50 cópias/mm³), 1 caso apresentava valores entre 51 e 100 cópias/mm³, 2 casos apresentavam valores entre 1000 e 10 000 cópias/mm³. Em 7 dos 28 casos a informação sobre o valor de carga viral na altura da colheita não estava disponível.

Em contrapartida, verificou-se uma concordância total de resultados para todas as amostras negativas e que correspondiam a 20 crianças em que não ocorreu a transmissão do VIH-1 da mãe ao filho.

Dos 28 casos de mães infetadas em que se obteve um resultado falso negativo foi possível analisar em 21 casos uma segunda amostra, derivada de uma colheita efetuada cerca de 2 meses após o parto. Estas segundas amostras estudadas resultaram em 12 casos positivos. Assim, com este modelo experimental não ocorreu amplificação em 9 de 21 amostras de mães infetadas por VIH-1.

A comparação entre os resultados esperados e os resultados obtidos para as primeiras amostras estão descritos na tabela 4.13 e para as segundas amostras na tabela 4.14.

4. Resultados

Tabela 4.13 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real submetendo previamente as amostras clínicas a reação de PCR Convencional para posteriormente serem utilizadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A selecionado.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real A			
Resultados esperados	Amostras clínicas Resultados obtidos		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro negativo	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)
Verdadeiro positivo	28 (22%)	100 (78%)	128 (100%)

Tabela 4.14 – Comparação geral entre os resultados esperados e os resultados obtidos por PCR em Tempo Real submetendo previamente as segundas amostras a reação de PCR Convencional para posteriormente serem utilizadas no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A selecionado.

Ensaio experimental de PCR em Tempo Real A			
Resultados esperados	Resultados obtidos Segundas amostras		
	Negativos	Positivos	Total
Verdadeiro positivo	9 (42,9%)	12 (57,1%)	21 (100%)

Para a análise estatística, fez-se a comparação dos resultados esperados com os resultados obtidos no ensaio experimental de PCR em Tempo Real A, para todas as 169 amostras clínicas estudadas (128 primeiras amostras+20 amostras negativas+21 segundas amostras), e obteve-se um valor de *Kappa* de 0,417, que indica existir concordância moderada de resultados segundo Landis and Koch, 1977.

No algoritmo experimental selecionado para o ensaio das amostras clínicas foi obtida uma sensibilidade de 75,2% e uma especificidade de 100%. No entanto, se atendermos aos 128 casos de mães VIH-1 infetadas e à análise das segundas amostras como sendo verdadeiros resultados, a detecção da infecção VIH-1 passa de 100 para 112 casos num total de 149 amostras o que corresponde a uma sensibilidade de 87,5%.

5. Discussão

A disponibilidade efetiva de uma técnica de detecção precoce para diagnóstico da transmissão do VIH-1 da mãe ao filho torna-se imperativa, pois a confirmação da infecção na criança permite o início de um programa terapêutico atempado, diminuindo o risco de desenvolvimento de SIDA nos primeiros anos de vida da criança [107–109].

Existem vários métodos de detecção da infecção VIH-1. No entanto, o diagnóstico precoce da infecção em criança nascidas de mães infetadas necessita de uma abordagem metodológica específica e sensível com detecção direta do vírus, estas características são descritas na literatura como estando associadas a técnicas de amplificação, nomeadamente a reações de PCR Convencional, bem como a técnicas de PCR em Tempo Real [107–109].

A técnica de PCR que foi implementada no laboratório para diagnóstico precoce da transmissão do VIH-1 da mãe ao filho, numa reação de *nested* PCR, é uma metodologia sensível e específica, mas que pode ser morosa comparativamente à técnica de PCR em Tempo Real. De fato, associa a uma amplificação dupla sequencial uma eletroforese em gel de agarose para detecção dos produtos amplificados. Devido à necessidade do manuseamento dos produtos de PCR, a técnica de *nested* PCR também tem a desvantagem de possuir um maior risco de ocorrência de contaminações [119,122,129].

Neste contexto desenvolver uma metodologia alternativa, que permitisse detetar precocemente a transmissão da mãe ao filho e que evitasse o manuseamento de produtos amplificados, foram objetivos principais do presente estudo.

A reação de PCR em Tempo Real com a utilização de um corante fluorescente (*SYBR green*) foi uma primeira abordagem ensaiada no início do estudo. Contudo, não foram ultrapassadas as dificuldades na otimização das reações com este sistema. Razões prováveis na base deste fato poderiam ser a formação de estruturas secundárias de dupla cadeia, onde o *SYBR green* tinha a capacidade de se intercalar, existindo uma emissão de sinal mas que corresponderia a produtos não específicos [126]. Nestes ensaios também não foi possível obter uma curva de *melting* concordante para a maioria das amostras analisadas o que também poderá sugerir a presença de uma elevada diversidade de sequências virais na população de amostras em estudo. Nestas condições, a otimização de reação teria de ser feita caso-a-caso o que não seguia o propósito deste estudo, que pretendia o desenvolvimento de uma metodologia alternativa para diagnóstico.

Por ser potencialmente mais específica, a técnica de PCR em Tempo Real utilizando um sistema de sondas TaqMan foi outra abordagem escolhida. Neste sistema é necessário que a combinação entre a sonda marcada e o conjunto de *primers* seja desenhado numa região do genoma alvo que seja relativamente conservada para que haja sucesso na amplificação dos diferentes subtipos virais em circulação na população. Por outro lado, existem vários critérios aos quais as sequências dos *primers* e sondas devem obedecer quando utilizados na técnica de PCR em Tempo Real. Os critérios comuns a ambos os oligonucleótidos são um conteúdo G+C entre 20 e 80%, o não possuir mais de 3 guaninas consecutivas e o não ter mais do que 2 guaninas e/ou citocinas nos 5 nucleótidos finais. Requisitos específicos para os *primers* incluem temperatura de *melting* entre 58 e 60° C e o tamanho do produto final não exceder os 150 pares de bases. No caso das sondas, a temperatura de *melting* deve situar-se entre 68 e 70°C, e a sequência não deve ter guaninas na extremidade 5' e deve possuir maior conteúdo em citocinas do que guaninas [143,144].

Tendo em conta estes critérios, selecionou-se e alterou-se alguns *primers* previamente utilizados na técnica de *nested* PCR para o diagnóstico precoce da infeção VIH-1. As alterações feitas basearam-se na deleção de alguns nucleótidos e substituição de outros por bases degeneradas em posições menos conservadas de modo a serem cumpridos os requisitos acima referidos. Foram desenhados *de novo* dois *primers* e uma sonda partindo de alinhamentos de sequências de referência contendo diferentes subtipos VIH-1 mais predominantes em Portugal.

Após o desenho e alteração de *primers* e sondas, foram desenvolvidos neste estudo quatro ensaios experimentais de PCR em Tempo Real (A, B, C, D) que combinam sondas TaqMan marcadas em 5' com FAM e em 3' com TAMRA com os *primers* desenhados na região LTR e na região *pol* do VIH-1. Neste ensaio foram submetidas amostras de ADN (diretamente obtidas através de CMSP ou indiretamente obtidas de plasma) e os potenciais produtos de PCR obtidos através de uma reação de PCR Convencional prévia.

Enquanto para a reação de PCR Convencional, as condições e a mistura de reação foram adaptadas a partir da técnica de *nested* PCR implementada no laboratório, para as reações de PCR em Tempo Real, as condições seguiram as recomendações do fabricante.

De modo a diminuir o risco de contaminação das amostras em estudo, os procedimentos de extração de ARN, a preparação das mistura de reação tanto para PCR Convencional como para PCR em Tempo Real, a adição de amostras (ADN, ADNc ou produto de PCR) e a amplificação e deteção dos produtos obtidos foram realizados em espaços fisicamente separados com fluxos unidirecionais de trabalho. Foram também incluídos controlos negativos das reações e caso existisse amplificação destas amostras o ensaio seria considerado inválido.

Os quatro ensaios experimentais desenvolvidos foram pré-avaliados através de um conjunto de amostras de referência, sendo posteriormente selecionado o algoritmo experimental com melhor desempenho para a deteção do VIH-1 e no qual foram testadas as amostras clínicas obtidas entre 2009 e 2011 no contexto do estudo da transmissão vertical do VIH-1 da mãe ao filho.

Nessa pré-avaliação da sensibilidade e especificidade dos ensaios experimentais desenvolvidos foram utilizados três grupos de amostras de referência: amostras positivas, algumas com o seu ADN VIH-1 quantificado e amostras positivas para VIH-2 (negativas para VIH-1). No caso das amostras VIH-1 positivas, que foram colhidas a indivíduos em tratamento anti-retrovírico, sendo que a maioria apresentava ARN VIH-1 indetetável. Para estas amostras era esperado um título de ADN proviral baixo e dificuldade de amplificação do VIH-1.

Após a realização dos ensaios experimentais A, B, C e D com o grupo de amostras de referência, com ADN VIH-1 quantificado, verificou-se que aquele que apresentava melhor desempenho era o ensaio A quando realizado a partir de amostras submetidas previamente a uma amplificação por PCR Convencional.

Comparando os resultados do ensaio de PCR em Tempo Real A com resultados conhecidos obtidos pela técnica de *nested* PCR observamos existir maior sensibilidade na

técnica de PCR em Tempo Real. De fato, o limite de detecção encontrado foi de 0,8 cópias/amostras enquanto para a técnica de *nested* PCR foi de 4 cópias/amostra.

No grupo de amostras de referência VIH-1 positivas e VIH-1 negativas (mas positivas para VIH-2) também se verificou melhor desempenho no ensaio de PCR em Tempo Real A, comparativamente aos restantes ensaios.

As amostras VIH-1 positivas foram estudadas quer a partir de ADN extraído de CMSP quer a partir de ADNc sintetizado de ARN extraído do plasma. Na comparação dos ensaios realizados, verificou-se que com a utilização de ADN derivado de CMSP se obteve novamente melhores resultados. A maioria dos casos (14 em 15 casos) estava sob efeito da terapêutica anti-retrovírica de prevenção, tendo valores baixos ou indetetáveis de ARN VIH-1 plasmático e também provavelmente um título de ADN proviral muito baixo. De fato, as amostras VIH-1 positivas especialmente as derivadas de plasma apresentavam um baixo potencial de amplificação do VIH-1.

Os resultados obtidos nesta pré-avaliação indicaram existir claramente maior sensibilidade na detecção dos casos VIH-1 positivos quando utilizado o ensaio experimental de PCR em Tempo Real A partindo de amostras de ADN submetidas a uma prévia amplificação por PCR Convencional. Nestas condições foi observada uma maior concordância entre os resultados esperados e os resultados obtidos para os diferentes grupos de amostras de referência.

A especificidade complementar do ensaio experimental A foi avaliada pela submissão de amostras negativas para o VIH-1, mas positivas para VIH-2. Verificou-se que não existiu amplificação para nenhuma das amostras estudadas, obtendo-se uma especificidade de 100% no ensaio.

Assim, o ensaio de PCR em Tempo Real A precedido da prévia amplificação de amostras de ADN por reação de PCR Convencional foi o algoritmo experimental escolhido para realizar os ensaios com amostras clínicas.

As 169 amostras clínicas utilizadas neste estudo incluíam 149 amostras colhidas a mães infetadas por VIH-1 (128 primeiras amostras e 21 segundas amostras) e também 20 amostras colhidas a crianças não infetadas (VIH-1 negativos).

No total das amostras maternas classificadas como positivas (n=128) não existiu sucesso na amplificação LTR do VIH-1 em 28 casos. A maioria dos casos com resultado falso-negativos apresentava informação de níveis de ARN VIH-1 abaixo das 50 cópias/mm³. No entanto, nos 100 casos em que ocorreu amplificação do VIH-1, 50% apresentavam também valor de carga viral indetetáveis.

Nas 21 segundas amostras maternas analisadas, que correspondiam a casos de mães com resultado falso-negativo nas primeiras amostras, observou-se que este resultado foi repetido em 9 amostras. O sucesso da amplificação do VIH-1 observado em 12 das 21 amostras pode ter sido devido à paragem da TAR de prevenção. Este fato conduziu a um

5. Discussão

provável aumento da carga viral em circulação plasmática e consequente aumento do título de ADN proviral do VIH-1 aquando da colheita da segunda amostra efetuada cerca de 2 meses após o parto.

Analisando os resultados conhecidos obtidos por *nested* PCR para as 128 primeiras amostras maternas verificou-se que se obteve sucesso de amplificação do VIH-1 em 101 amostras. Em 27 casos foram obtidos resultados falso-negativos. Neste último grupo o valor de carga viral era indetetável para 74% das amostras avaliadas.

Contudo, nos resultados do ensaio de *nested* PCR para as 21 segundas amostras verificou-se que existiu amplificação do ADN VIH-1 em todos os casos.

Na comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas, *nested* PCR e PCR em Tempo Real, verificou-se que no grupo de amostras de mães infetadas VIH-1 existiu concordância de resultados em 99 casos para ambas as técnicas, sendo que 88 foram positivas e 11 foram resultados falso-negativos (Tabela 5.1). No caso das segundas amostras, existiu concordância de resultados em apenas 12 casos, sendo que em 9 amostras foi obtido resultado positivo por *nested* PCR e resultado falso-negativo em PCR em Tempo Real (Tabela 5.2).

Assim, embora a diferença de resultados entre as duas técnicas não seja significativa, a técnica de PCR em Tempo Real apresentou mais 3 casos de resultado falso-negativo comparativamente à técnica de *nested* PCR, quando estudadas as 128 amostras positivas de mães infetadas por VIH-1. No entanto, para as 21 segundas amostras a diferença de resultados obtidos mostrou que a técnica de *nested* PCR possuía maior desempenho na deteção da infeção VIH-1.

Tabela 5.1 – Comparação de resultados conhecidos na técnica de *nested* PCR e com os resultados obtidos no ensaio de PCR em Tempo Real A para as 128 amostras positivas derivadas de mães infetadas por VIH-1.

Comparação entre os resultados obtidos		Ensaio de PCR em Tempo Real A		Total
		Negativos	Positivos	
Nested PCR	Negativos	11 (41%)	16 (59%)	27
	Positivos	13 (13%)	88 (87%)	101

Tabela 5.2 – Comparação de resultados obtidos na técnica de *nested* PCR e com os resultados obtidos no ensaio de PCR em Tempo Real A para as 21 segundas amostras colhidas a mães infetadas por VIH-1.

Comparação entre os resultados obtidos		Ensaio de PCR em Tempo Real A		Total
		Negativos	Positivos	
Nested PCR	Negativos	0	0	0
	Positivos	9	12	21

Valores de especificidade e sensibilidade foram calculados através do grupo de amostras clínicas. Para a técnica de PCR em Tempo Real obteve-se o valor de sensibilidade de 75,2% e de especificidade de 100%, enquanto na técnica de *nested* PCR obteve-se o valor de sensibilidade de 81,9% e de especificidade de 100%.

O valor elevado de especificidade é fundamentado no fato de em nenhuma das técnicas ter existido sinal de amplificação quando utilizadas amostras de casos negativos para VIH-1 (incluindo amostras positivas para o VIH-2).

Na pré-avaliação dos ensaios experimentais desenvolvidos verificou-se que o limite de detecção da técnica de PCR em Tempo Real era mais baixo comparativamente com a técnica de *nested* PCR e por isso, possivelmente mais sensível na detecção da infeção VIH-1. No entanto, durante os ensaios com amostras clínicas não foi possível observar esta tendência, existindo mesmo uma maior sensibilidade da técnica de *nested* PCR para o grupo das amostras clínicas analisadas.

Na avaliação do desempenho das técnicas calculou-se o valor de *Kappa*, que mede o grau de concordância entre o resultado esperado e o resultado obtido para a mesma amostra [145], e também o valor de *McNemar*, que se utiliza quando existe mais do que um resultado para a mesma amostra, de modo a calcular o grau de concordância de resultados entre técnicas [146]. Assim, foi obtido para a técnica de PCR em Tempo Real um valor de *Kappa* de 0,417 e para a técnica de *nested* PCR um valor de 0,565. O valor de *Kappa* varia entre <0 (concordância fraca) e 1 (concordância quase perfeita). O intervalo de valores entre 0,41 e 0,60 indica uma concordância moderada entre os resultados esperados e os resultados obtidos.

Na comparação dos resultados obtidos pela técnica já implementada de *nested* PCR e de PCR em Tempo Real foi obtido um valor de *McNemar* de 0,034, ou seja, um valor abaixo de 0,05, o que indica que a dimensão da amostra clínica estudada não é suficiente para que se possa concluir com segurança estatística o significado das diferenças obtidas entre as duas técnicas.

Existem hipóteses explicativas para a existência de resultados falso-negativos por técnicas moleculares como por exemplo a presença de terapêutica HAART pode conduzir ao sequestro dos vírus em locais de difícil acesso, resultando numa baixa carga viral plasmática e influenciando o título de ADN proviral pela redução do número de células infetadas [147].

Esta hipótese poderá explicar a existência de resultados falso-negativos para ambas as técnicas, visto que as amostras dos indivíduos infetados apresentam, na sua maioria, valores de carga viral abaixo de 50 cópias/mm³ (indetectável) e encontram-se sob terapêutica anti-retrovírica.

Em relação ao tempo necessário para obtenção de resultados, o ensaio de PCR em Tempo Real permite processar as amostras em cerca de 3h30 após o início da reação, enquanto na técnica de *nested* PCR são necessárias cerca de 5h para as reações de amplificação e ainda a realização de uma eletroforese em gel de agarose para a visualização dos resultados.

5. Discussão

A metodologia de PCR em Tempo Real apresenta-se como uma boa alternativa à *nested* PCR nos ensaios desenvolvidos necessitando de ser melhorada em termos de sensibilidade para detecção de VIH-1 em amostras clínicas. Provavelmente, o desenvolvimento de um método tendo como alvo outras regiões genómicas do VIH-1 pode ser uma hipótese a desenvolver num futuro próximo.

A técnica de *nested* PCR já implementada no laboratório apresenta uma maior sensibilidade, continuando por isso, de momento, a ser a técnica mais adequada para o diagnóstico precoce da infeção VIH-1.

6. Conclusão

6. Conclusão

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um algoritmo para diagnóstico precoce da infecção VIH-1, alternativo à técnica de *nested* PCR, que permitisse obter ganhos na sensibilidade e no tempo de processamento das amostras. Para tal, foram desenvolvidos vários ensaios experimentais baseados na reação de PCR em Tempo Real.

Foi selecionado o ensaio experimental A desenvolvido para a amplificação da região LTR do VIH-1. Este algoritmo possibilitou:

- Verificar um aumento da sensibilidade do ensaio quando usadas amostras previamente submetidas a amplificação por PCR convencional.
- Obter uma especificidade de 100%, uma sensibilidade de 86,7% e um limite de deteção de ADN VIH-1 de 0,8 cópias/amostra, para as amostras de referência.
- Obter uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 75,2% para amostras clínicas.
- A deteção ou confirmação da infecção VIH-1 em 87,5% dos casos estudados.
- Uma concordância moderada entre os resultados esperados e os resultados obtidos das amostras em análise.
- Ganhos no tempo de processamento das amostras e na saída de resultados.
- Uma diminuição do risco de eventuais contaminações no ensaio por uma menor manipulação dos produtos amplificados.

Assim, a metodologia de PCR em Tempo Real apresenta-se como uma potencial alternativa à técnica de *nested* PCR. No entanto, estudos futuros neste âmbito devem incidir no aumento da sensibilidade do algoritmo de PCR em Tempo Real descrito, investigando a influência da amplificação de outras regiões genómicas alvo, e com um maior número de amostras clínicas VIH-1 positivas no sentido de um melhor tratamento estatístico dos resultados.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- 1 Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220**:868–871.
- 2 Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease* 2011; **6**:223–248.
- 3 Gottlieb M, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A, Schroff R, *et al.* *Pneumocystis carinii* - Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men - Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine* 1981; **305**:1425–1431.
- 4 Yilmaz G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology* 2001; **21**:187–196.
- 5 Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, England; 2007.
- 6 Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science* 2000; **287**:607–614.
- 7 Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; **397**:436–441.
- 8 Daniel MD, Li Y, Naidu YM, Durda PJ, Schimdt DK, Sehgal PK, *et al.* Simian Immunodeficiency Virus from African Green Monkeys. *Journal of Virology* 1988; **62**:4123–4128.
- 9 Baier M, Werner A, Cichutek K, Garber C, Müller C, Kraus G, *et al.* Molecularly Cloned Simian Immunodeficiency Virus SIVagm3 Is Highly Divergent from Other SIVagm Isolates and Is Biologically Active In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology* 1989; **63**:5119–5123.
- 10 Rey-Cuillé M-A, Berthier J-L, Bomsel-Demontoy M-C, Chaduc Y, Montagnier L, Hovanessian AG, *et al.* Simian Immunodeficiency Virus Replicates to High Levels in Sooty Mangabeys without Inducing Disease. *Journal of Virology* 1998; **72**:3872–3886.
- 11 Burger H, Weiser B, Flaherty K, Gulla J, Nguyen P-N, Gibbs RA. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 nucleotide sequence diversity among close contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; **88**:11236–11240.
- 12 McCutchan FE. Global Epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology* 2006; **78**:7–12.
- 13 Ferreira O. Origem do VIH. In: *Ed. Francisco Antunes, Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal*. 2001. pp. 3–11.
- 14 Goldberg B, Stricker RB. Bridging the Gap: Human Diploid Cell Strains and the Origin of AIDS. *Journal of Theoretical Biology* 2000; **204**:497–503.
- 15 Hooper E, Korber B, Bhattacharya T, Theiler J, Gupta R, Lapedes A, *et al.* Search for the Origin of HIV and AIDS. *Science* 2000; **289**:1140–1141.
- 16 Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC, Hui H, Biggar RJ, *et al.* Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 2: Evidence for Distinct Sequence Subtypes with Differences in Virus Biology. *Journal of Virology* 1994; **68**:7433–7447.
- 17 Chen Z, Luckay A, Sodora DL, Telfer P, Reed P, Gettie A, *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Seroprevalence and Characterization of a Distinct HIV-2 Genetic Subtype from the Natural Range of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Sooty Mangabeys. *Journal of Virology* 1997; **71**:3953–3960.
- 18 International Committee on Taxonomy of Viruses disponível em <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>. Acedido em 15/02/2012.
- 19 Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: *Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997*.
- 20 Turner BG, Summers MF. Structural Biology of HIV. *Journal of Molecular Biology* 1999; **285**:1–32.
- 21 Hutchinson JF. The Biology and Evolution of HIV. *Annual Review of Anthropology* 2001; **30**:85–108.
- 22 Lourenço H. Ciclo Biológico de VIH. In: *Ed. Francisco Antunes, Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal*. 2001. pp. 13–19.
- 23 Levy JA. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews* 1993; **57**:183–289.
- 24 Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: Abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; **90**:6900–6903.
- 25 Markovitz DM, Hannibal M, Perez VL, Gauntt C, Folks TM, Nabel GJ. Differential regulation of human immunodeficiency viruses (HIVs): A specific regulatory element in HIV-2 responds to stimulation of the T-cell antigen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; **87**:9098–9102.
- 26 Freed EO. HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 2001; **26**:13–33.
- 27 Freed EO. HIV-1 Gag Proteins : Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology* 1998; **251**:1–15.
- 28 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**:367–377.
- 29 Lederman MM, Veazey RS, Offord R, Mosier DE, Dufour J, Mefford M, *et al.* Prevention of Vaginal SHIV Transmission in Rhesus Macaques Through Inhibition of CCR5. *Science* 2004; **306**:485–487.
- 30 Azevedo-Pereira J. Ciclo Biológico do VIH. *Ed Francisco Antunes, Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal* 2001; 9–26.

7. Referências Bibliográficas

- 31 Blattner WA. HIV epidemiology: past, present, and future. *The FASEB Journal* 1991; **5**:2340–2348.
- 32 Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, Valenza A, Paolucci S, Sampaolesi R, *et al.* Clinical Use of Quantitative Molecular Methods in Studying Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 1996; **9**:135–147.
- 33 Kostrikis LG, Touloumi G, Karanickolas R, Pantazis N, Anastassopoulou C, Karafoulidou A, *et al.* Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Forms with the Second Template Switch in Peripheral Blood Cells Predicts Disease Progression Independently of Plasma RNA Load. *Journal of Virology* 2002; **76**:10099–10108.
- 34 Pierson T, Mcarthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: Mechanisms for Viral Persistence in the Presence of Antiviral Immune Responses and Antiretroviral Therapy. *Annual Review of Immunology* 2000; **18**:665–708.
- 35 Swanstrom R, Wills JW. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- 36 Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV Infection. *Annual Review of Microbiology* 1996; **50**:825–854.
- 37 Piatak M, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, *et al.* High Levels of HIV-1 in Plasma During All Stages of Infection Determined by Competitive PCR. *Science* 1993; **259**:1749–1754.
- 38 Sousa AE de, Victorino R. Imunopatogénese e Resposta Imunológica. In: Ed. Francisco Antunes, *Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal*. 2001. pp. 30–51.
- 39 Gurunathan S, Habib RE, Baglyos L, Meric C, Plotkin S, Dodet B, *et al.* Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. *Vaccine* 2009; **27**:1997–2015.
- 40 Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, *et al.* High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *The New England journal of medicine* 1991; **324**:954–960.
- 41 Fauci AS, Masur H, Gelmann EP, Markham PD, Hahn BH, Lane HC. The Acquired Immunodeficiency Syndrome: An Update. *Annals of Internal Medicine* 1985; **102**:800–813.
- 42 Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology* 1999; **17**:657–700.
- 43 Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; **422**:307–312.
- 44 Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**:4144–4149.
- 45 Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. Immunopathogenic Mechanisms in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Annals of Internal Medicine* 1991; **114**:678–693.
- 46 Hatzakis A, Touloumi G, Karanickolas R, Karafoulidou A, Mandalaki T, Anastassopoulou C, *et al.* Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *The Lancet* 2000; **355**:599–604.
- 47 Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. *Science* 1996; **271**:1582–1586.
- 48 Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection. *Annual Review of Medicine* 2002; **53**:557–593.
- 49 Chun T, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, *et al.* HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; **115**:3250–3255.
- 50 Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, *et al.* Residual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia in Some Patients on Antiretroviral Therapy Is Dominated by a Small Number of Invariant Clones Rarely Found in Circulating CD4+ T Cells. *Journal of Virology* 2006; **80**:6441–6457.
- 51 Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Medicine* 1999; **5**:512–517.
- 52 Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, *et al.* The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nature medicine* 2000; **6**:82–85.
- 53 Minkoff H. Human Immunodeficiency Virus Infection in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 2003; **101**:797–810.
- 54 Lehman DA, Farquhar C. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Reviews in Medical Virology* 2007; **17**:381–403.
- 55 Thorne C, Newell M-L. Epidemiology of HIV infection in the newborn. *Early Human Development* 2000; **58**:1–16.
- 56 Newell M-L. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS* 1998; **12**:831–837.
- 57 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**:487–491.

7. Referências Bibliográficas

- 58 Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, *et al.* The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *The New England Journal of Medicine* 1987; **317**:185–191.
- 59 Gulick RM, Mellors JW, Havlir DV, 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. *The New England Journal of Medicine* 1997; **337**:734–739.
- 60 Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, *et al.* A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *The New England Journal of Medicine* 1997; **337**:725–733.
- 61 Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, *et al.* A Trial Comparing Nucleoside Monotherapy with Combination Therapy in HIV-Infected Adults with CD4 Cell Counts from 200 to 500 per Cubic Millimeter. *The New England Journal of Medicine* 1996; **335**:1081–1090.
- 62 Katzenstein DA, Hammer SM, Hughes MD, Gundacker H, Jackson JB, Fiscus S, *et al.* The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV-infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. *The New England Journal of Medicine* 1996; **335**:1091–1098.
- 63 Hogg RS, Yip B, Kully C, Craib KJP, O'Shaughnessy MV, Schechter MT, *et al.* Improved survival among HIV-infected patients after initiation of triple-drug antiretroviral regimens. *Canadian Medical Association journal* 1999; **160**:659–665.
- 64 Mocroft A, Gill MJ, Davidson W, Phillips AN. Predictors of a viral response and subsequent virological treatment failure in patients with HIV starting a protease inhibitor. *AIDS* 1998; **12**:2161–2167.
- 65 Antunes F. Estratégias e progressos na terapêutica antirretroviral. In: Ed. Francisco Antunes, *Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal*. 2001. pp. 239–248.
- 66 Wainberg MA, Jeang K-T. 25 years of HIV-1 research – progress and perspectives. *BMC Medicine* 2008; **6**:31–38.
- 67 Hammer SM, Eron JJ, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, *et al.* Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. *The Journal of the American Medical Association* 2008; **300**:555–570.
- 68 Casabianca A, Gori C, Orlandi C, Forbici F, Federico C, Magnani M. Fast and sensitive quantitative detection of HIV DNA in whole blood leucocytes by SYBR green I real-time PCR assay. *Molecular and Cellular Probes* 2007; **21**:368–378.
- 69 Autran B, Carcelain G. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4 + T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; **377**:112–117.
- 70 Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, *et al.* Persistence of HIV-1 Transcription in Peripheral-blood Mononuclear Cells in Patients Receiving Potent Antiretroviral Therapy. *The New England Journal of Medicine* 1999; **340**:1614–1622.
- 71 Chun T-W, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JM, Baseler M, *et al.* Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; **94**:13193–13197.
- 72 Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, *et al.* Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997; **387**:188–191.
- 73 Tamalet C, Lefeuvre A, Fantini J, Poggi C, Yahi N. Quantification of HIV-1 viral load in lymphoid and blood cells: assessment during four-drug combination therapy. *AIDS* 1997; **11**:895–901.
- 74 Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, *et al.* Maternal Viral Load, Zidovudine Treatment, and the Risk of Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Mother to Infant. *The New England Journal of Medicine* 1996; **335**:1621–1629.
- 75 WHO. Global HIV/Aids Response - Progress Report. ; 2011.
- 76 Gray GE, McIntyre JA. HIV and pregnancy. *BMJ (Clinical research ed)* 2007; **334**:950–953.
- 77 Instituto nacional de saúde Dr. Ricardo Jorge - www.insa.pt. Acedido em 25/07/2012.
- 78 Paixão MT. Epidemiologia da infecção VIH e SIDA: o impacto mundial. In: Ed. Francisco Antunes, *Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal*. 2001. pp. 55–60.
- 79 Paixão MT, Pádua E. Transmissão da infecção por VIH. In: Ed. Francisco Antunes, *Manual sobre a SIDA, Permanyer Portugal*. 2001. pp. 75–79.
- 80 Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN, *et al.* Genetic and Phylogenetic Analysis of *env* Subtypes G and H in Central Africa. *Aids Research and Human Retroviruses* 1994; **10**:877–879.
- 81 Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD. Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains from Patients in Cyprus: Identification of a New Subtype Designated Subtype I. *Journal of Virology* 1995; **69**:6122–6130.
- 82 Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *The New England Journal of Medicine* 2009; **358**:1590–1602.
- 83 Simon F, Maucière P, Roques P, Lousset-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine* 1998; **4**:1032–1037.

7. Referências Bibliográficas

- 84 Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* 2009; **15**:871–872.
- 85 Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003; **17**:2547–2560.
- 86 Ayouba A, Souquière S, Njinku B, Martin PMV, Müller-Trutwin MC, Roques P, *et al.* HIV-1 group N among HIV-1 seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 2000; **14**:2623–2625.
- 87 Baar MP de, Timmermans EC, Bakker M, Rooij E de, Gemen B van, Goudsmit J. One-Tube Real-Time Isothermal Amplification Assay To Identify and Distinguish Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes A, B, and C and Circulating Recombinant Forms AE and AG. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39**:1895–1902.
- 88 Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, *et al.* Near-Full-Length Genome Sequencing of Divergent African HIV Type 1 Subtype F Viruses Leads to the Identification of a New HIV Type 1 Subtype Designated K. *Aids Research and Human Retroviruses* 2000; **16**:139–151.
- 89 Los alamos HIV Database - <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>. Acedido em 15/09/2012.
- 90 Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype Distribution in the Worldwide Epidemic: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *Journal of Virology* 2007; **81**:10209–10219.
- 91 Gao F, Robertson DL, Morrison SG, Hui H, Craig S, Decker J, *et al.* The Heterosexual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Epidemic in Thailand is Caused by an Intersubtype (A/E) Recombinant of African Origin. *Journal of Virology* 1996; **70**:7013–7029.
- 92 Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; **20**:13–23.
- 93 Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM. Genetic and phylogenetic evolution of HIV-1 in a low subtype heterogeneity epidemic: the Italian example. *Retrovirology* 2007; **4**:34–43.
- 94 Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello M, Buonaguro FM. Evolution of the HIV-1 V3 region in the Italian epidemic. *The New Microbiologica* 2007; **30**:1–11.
- 95 Duque V, Holguín À, Silvestre M, González-Lahoz J, Soriano V. Human immunodeficiency virus type 1 recombinant B/G subtypes circulating in Coimbra, Portugal. *Clinical Microbiology and Infection* 2003; **9**:422–425.
- 96 Palma AC, Araújo F, Duque V, Borges F, Paixão MT, Camacho R. Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution* 2007; **7**:391–398.
- 97 Esteves A, Parreira R, Venenno T, Franco M, Piedade J, Germano De Sousa J, *et al.* Molecular Epidemiology of HIV Type 1 Infection in Portugal: High Prevalence of Non-B Subtypes. *Aids Research and Human Retroviruses* 2002; **18**:313–325.
- 98 Parry JV, Mortimer PP, Perry KR, Pillay D, Zuckerman M. Towards error-free HIV diagnosis: guidelines on laboratory practice. *Communicable Disease and Public Health* 2003; **6**:334–350.
- 99 Esteves A, Parreira R, Piedade J, Venenno T, Franco M, Germano De Sousa J, *et al.* Spreading of HIV-1 Subtype G and envB/gagG Recombinant Strains among Injecting Drug Users in Lisbon, Portugal. *Aids Research and Human Retroviruses* 2003; **19**:511–517.
- 100 Pádua E, Almeida C, Nunes B, Cortes Martins H, Castela J, Neves C, *et al.* Assessment of mother-to-child HIV-1 and HIV-2 transmission: an AIDS reference laboratory collaborative study. *HIV medicine* 2009; **10**:182–190.
- 101 Op de Coul ELM, Prins M, Cornelissen M, van der Schoot A, Boufassa F, Brettler RP, *et al.* Using phylogenetic analysis to trace HIV-1 migration among western European injecting drug users seroconverting from 1984 to 1997. *AIDS* 2001; **15**:257–266.
- 102 Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid Turnover of Plasma Virions and CD4 Lymphocytes in HIV-1 Infection. ; 1995.
- 103 Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; **11**:466–474.
- 104 Peeters M. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. *HIV Databases Review Article* 2001; :1–19.
- 105 Wong EY, Hewlett IK. HIV diagnostics: challenges and opportunities. *HIV Therapy* 2010; **4**:399–412.
- 106 Kuhn L, Abrams E, Matheson P, Thomas P, Lambert G, Bamji M, *et al.* Timing of maternal-infant HIV transmission: associations between intrapartum factors and early polymerase chain reaction results. *AIDS* 1997; **11**:429–435.
- 107 Avettand-Fènoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, *et al.* LTR Real-Time PCR for HIV-1 DNA Quantitation in Blood Cells for Early Diagnosis in Infants Born to Seropositive Mothers Treated in HAART Area (ANRS CO 01). *Journal of Medical Virology* 2009; **81**:217–223.
- 108 Stevens W, Erasmus L, Moloi M, Taleng T, Sarang S. Performance of a Novel Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Total Nucleic Acid-Based Real-Time PCR Assay Using Whole Blood and Dried Blood Spots for Diagnosis of HIV in Infants. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; **46**:3941–3945.

7. Referências Bibliográficas

- 109 Kusumi K, Conway B, Cunningham S, Berson A, Evans C, Iversen AKN, *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Gene Structure and Diversity In Vivo and after Cocultivation In Vitro. *Journal of Virology* 1992; **66**:875–885.
- 110 Coste J, Montes B, Reynes J, Peeters M, Segarra C, Vendrell J-P, *et al.* Comparative Evaluation of Three Assays for the Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *Journal of Medical Virology* 1996; **50**:293–302.
- 111 Murphy DG, Gonin P, Fauvel M. Reproducibility and Performance of the Second-Generation Branched-DNA Assay in Routine Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**:812–814.
- 112 Désiré N, Dehée A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard P-M, *et al.* Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39**:1303–1310.
- 113 Shehu-xhilaga M, Tachedjian G, Crowe SM, Kedzierska K. Antiretroviral Compounds: Mechanisms Underlying Failure of HAART to Eradicate HIV-1. *Current Medicinal Chemistry* 2005; **12**:1705–1719.
- 114 Marcello A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology* 2006; **3**:7–16.
- 115 Beloukas A, Paraskevis D, Haida C, Sypsa V, Hatzakis A. Development and Assessment of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; **47**:2194–2199.
- 116 Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American Library* 1990; :36–43.
- 117 Newton CR, Graham A. *PCR*. Second Edi. BIOS Scientific Publishers Limited, UK; 1997.
- 118 Kubista M, Andrade JM, Bengtsson Ma, Forootan A, Jonák J, Lind K, *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; **27**:95–125.
- 119 Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 2002; **30**:1292–1305.
- 120 Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD. Nucleic Acid Amplification In Vitro: Detection of Sequences with Low Copy Numbers and Application to Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 1989; **2**:217–226.
- 121 Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques* 1999; **26**:112–125.
- 122 Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2005; **5**:209–219.
- 123 Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; **30**:503–512.
- 124 Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas J, Marechal V. Quantitative Analysis of Human Herpesvirus 8 Viral Load Using a Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; **38**:1404–1408.
- 125 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; **19**:165–256.
- 126 Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, *et al.* Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003; **3**:18–31.
- 127 Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, *et al.* Quantitation of Hepatitis B Virus Genomic DNA by Real-Time Detection PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**:2899–2903.
- 128 Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Hämmerle T. Quantitation of Viral DNA by Real-Time PCR Applying Duplex Amplification, Internal Standardization, and Two-Color Fluorescence Detection. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; **67**:2837–2839.
- 129 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 1996; **6**:986–994.
- 130 Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Research* 1996; **6**:995–1001.
- 131 Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; **1494**:23–27.
- 132 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991; **88**:7276–7280.
- 133 Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *Genome Research* 1995; **4**:357–362.
- 134 Clementi M. Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; **38**:2030–2036.
- 135 Josefsson A, Livak K, Gyllensten U. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus by Using the Fluorescent 5' Exonuclease Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**:490–496.
- 136 Ryncarz AJ, Goddard J, Wald A, Huang M, Roizman B, Corey L. Development of a High-Throughput Quantitative Assay for Detecting Herpes Simplex Virus DNA in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**:1941–1947.

7. Referências Bibliográficas

- 137 Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; **10**:190–212.
- 138 Clementi M, Menzo S, Manzin A, Bagnarelli P. Quantitative molecular methods in virology. *Archives of Virology* 1995; **140**:1523–1539.
- 139 Zhao Y, Yu M, Miller JW, Chen M, Bremer EG, Kabat W, *et al.* Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA by Using TaqMan Technology. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**:675–678.
- 140 Butler SL, Hansen MST, Bushman FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nature Medicine* 2001; **7**:631–634.
- 141 Cobb BR, Vaks JE, Do T, Vilchez RA. Evolution in the sensitivity of quantitative HIV-1 viral load tests. *Journal of Clinical Virology/clinical virology* 2011; **52**:77–82.
- 142 Schaade L, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M. Detection of Cytomegalovirus DNA in Human Specimens by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; **38**:4006–4009.
- 143 Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999; **11**:305–312.
- 144 Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; **148**:257–66.
- 145 Fleiss JL, Cohen J. Large sample standard errors of Kappa and weighted Kappa. *Psychological Bulletin* 1969; **72**:323–327.
- 146 Sun X, Yang Z. Generalized McNemar's Test for Homogeneity of the Marginal Distributions. *SAS Global Forum* 2008; **382**:1–10.
- 147 Zazzi M, Romano L, Catucci M, Milito AD, Almi P, Gonnelli A, *et al.* Low Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) DNA Burden as a Major Cause for Failure To Detect HIV-1 DNA in Clinical Specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**:205–208.