

HIV

PCR QUALITATIVO, QUANTITATIVO E GENOTIPAGEM

A síndrome imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença retroviral, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), caracterizada por imunossupressão profunda com diminuição da população de linfócitos T CD4+, que leva a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas. Até o presente, foram identificados dois tipos de HIV que causam AIDS: o HIV-1, isolado pela primeira vez em 1983 e o HIV-2, um segundo tipo correlato, mas distinto, que foi isolado pela primeira vez em 1985. O HIV-1 é o tipo predominante e encontra-se distribuído por todos os países do mundo, enquanto o HIV-2 tem sido isolado, principalmente, na África Ocidental Guiné Bissau, Costa do Marfim e Senegal, com alguns casos síndrome da (AIDS) é uma pelo vírus da identificados nas Américas e Europa Ocidental. Este tipo no Brasil é raramente encontrado.

A infecção por HIV pode ser transmitida por contato sexual, exposição a sangue infectado ou a produtos derivados do sangue, ou por passagem de vírus de mães infectadas para seus recém-nascidos. A infecção por HIV pode ser dividida em três fases distintas: inicia-se com uma infecção primária ou aguda, seguida por uma fase intermediária assintomática (ou de latência clínica), também chamada de período de latência. A terceira fase é caracterizada por uma alta susceptibilidade do paciente a infecções oportunistas e é quando o indivíduo afetado pelo HIV passa a ser um doente com AIDS.

TESTES MOLECULARES (PCR) NA INFECÇÃO POR HIV

Nos últimos anos ocorreu o surgimento de tecnologias de amplificação molecular, como é o caso da PCR (Polymerase Chain Reaction), uma ferramenta única para um diagnóstico mais direto e de maior sensibilidade na infecção por HIV-1 e para análise molecular da atividade viral *in vivo e in vitro*. **A grande vantagem da utilização dos testes moleculares para o diagnóstico e acompanhamento do paciente com HIV é que o resultado não depende de uma resposta imunológica ao vírus, que pode levar até 6 meses ou mais para ocorrer. É testado diretamente a presença do ácido nucléico viral (RNA), podendo detectar a infecção antes da soroconversão ocorrer.**

UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS RESULTADOS QUALITATIVOS

O teste qualitativo, por ser de maior sensibilidade quando comparado à Carga Viral (Teste Quantitativo) está indicado para o diagnóstico da infecção por HIV nos seguintes casos:

- Identificação de indivíduos infectados durante a janela imunológica (antes da soroconversão);
- Pacientes com sorologia positiva ou indeterminada;
- Pacientes com antecedentes de uso de drogas endovenosas;
- Profissionais de saúde após exposição ocupacional;
- Crianças nascidas de mães HIV-1 positivas, já que os anticorpos maternos podem persistir de 5 a 14 meses em níveis detectáveis;
- Pacientes imunossuprimidos.

UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS RESULTADOS QUANTITATIVOS (CARGA VIRAL)

O teste quantitativo por PCR (AMPLICOR HIV-1 Monitor) é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* destinado à quantificação do RNA do HIV no plasma humano. Destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais, como indicador prognóstico da doença, com vista ao tratamento clínico de pacientes infectados pelo HIV-1.

Os níveis de carga viral são de grande importância no prognóstico e na monitoração terapêutica do esquema antiretroviral utilizado no paciente. **Enquanto taxas de CD4+ levam cerca de 3 meses para refletirem uma resposta ao tratamento, a carga viral pode apresentar variação em poucas semanas.**

Este teste não se destina a ser utilizado para rastreio nem como um teste diagnóstico visando confirmar a presença de infecção por HIV-1. As indicações clínicas do teste quantitativo são:

- Avaliação do prognóstico de um paciente por determinação da carga viral inicial (antes do início do tratamento);
- Avaliação da resposta viral à terapêutica antiretroviral, determinada através de alterações dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 durante o tratamento.

SIGNIFICADO CLÍNICO DOS RESULTADOS

Após a infecção pelo HIV e durante o curso da doença, bilhões de vírus são produzidos e destruídos diariamente. Após a infecção primária, a carga viral atinge um ponto de equilíbrio em cada indivíduo. Este ponto parece estar entre 100 e 1 000 000 de cópias de RNA por mL de plasma e permanece relativamente estável durante meses e possivelmente anos.

O ponto de equilíbrio da carga viral está fortemente associado com a escala de progressão da doença e tempo até a morte. Indivíduos com linhas basais de níveis de RNA de HIV abaixo de 5000 cópias/mL possuem menor risco, enquanto que indivíduos com cerca de 50000 cópias/mL possuem grande risco de progressão da doença. **Níveis de RNA de HIV são os mais importantes fatores preditivos da progressão da doença. A contagem de linfócitos CD4+, por outro lado, é o mais importante marcador de prognóstico imediato nestes doentes.** Assim níveis de RNA de HIV podem auxiliar a estimar o início dos sintomas relacionados ao HIV que são preditivos de alto risco para a ocorrência de infecções oportunistas.

VERIFICAÇÃO DA RESPOSTA À TERAPIA

A carga viral também é recomendada como guia, juntamente com a contagem de células T CD4+ e com a condição física do paciente, para a verificação de resposta à terapia. Vários estudos utilizando combinações de drogas antiretrovirais mostraram forte redução no título de RNA do HIV-1 dentro de algumas semanas.

Uma consideração importante a ser feita na avaliação de resposta pela quantificação de RNA viral é a flutuação dos níveis virais. **Devem ser considerados como variações significantes alterações de pelo menos 0,5 Log, para descartar variabilidade biológica da concentração viral.**

Após o início da terapia, espera-se uma queda dos níveis de RNA viral de 1,5 a 2 log em um período de 4 semanas de tratamento (quando o exame deverá ser repetido). Uma resposta precoce está associada a maior probabilidade de supressão viral.

Em pacientes com contagem superior a 100.000 cópias/mL, o declínio da carga viral pode ser mais demorado. Em um período de 16 a 24 semanas de tratamento, espera-se que exista supressão viral levando a resultados de carga viral indetectáveis. Caso isto não ocorra, é necessário investigar a causa desta falência terapêutica.

A principal causa para isto é relacionada a problemas de aderência do paciente ao esquema medicamentoso. Muito mais raramente, problemas de absorção das drogas ou resistência viral às drogas podem ser responsabilizados.

Uma importante recomendação prática é a de sempre repetir, no mesmo laboratório, em duas visitas, as contagens de CD4+ e carga viral antes de introduzir ou modificar a terapia. A monitorização destes parâmetros laboratoriais deve ser realizada mensalmente em períodos de início ou modificação da terapia e a cada três meses, após sua estabilização.

As combinações multidrogas parecem reduzir o impacto clínico da resistência viral às drogas. Entretanto, como o vírus apresenta expressiva mutação, as formas resistentes surgem por mecanismo de seleção. **Os testes e resistência às drogas têm sido propostos para a seleção de alternativas terapêuticas, sendo a genotipagem do HIV o método mais corrente em nosso meio.** Sugere-se que este teste seja realizado em situações de alto risco: pacientes com falência no tratamento, indivíduos que requerem tratamento de resgate, gestantes e na profilaxia pós-acidentes.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Um teste com resultado “Abaixo do limite de detecção” não exclui a possibilidade de exposição ou infecção pelo HIV-1.
- O teste AMPLICOR HIV-1 foi otimizado para o Grupo M do HIV-1, subtipos A-H. O desempenho do teste com o Grupo O do HIV-1 e com HIV-2 é desconhecido. Apesar de serem relativamente raros no Brasil, este teste não deverá ser usado para controle clínico de doentes infectados com o Grupo O do HIV-1 ou com o HIV- 2.
- Além da carga viral, outros fatores virais ou imunopatológicos podem contribuir para as taxas variáveis dos números de linfócitos T CD4+ e o resultado clínico da doença.
- Os testes qualitativo e genotipagem foram validados para utilização exclusiva com sangue total colhido com EDTA. O teste de outros tipos de amostra podem dar origem a resultados falsos negativos ou falsos positivos. A heparina inibe a PCR; não se devem utilizar amostras colhidas usando heparina como anticoagulante.
- A obtenção de resultados confiáveis depende da colheita adequada da amostra e dos procedimentos de transporte, armazenamento e processamento. As amostras podem ser congeladas e descongeladas até 3 vezes no máximo.

Bibliografia

1. Science,272: 1124-5 May24, 1996.
2. J Clin Microbiology, 31:2557-2564, 1994.
3. Science,239:610-616, 1998
4. J Med Virol. 2003 Dec;71 (4):475-9.
5. www.aids.gov.br

	PCR Qualitativo	PCR Quantitativo Padrão	PCR Quantitativo UltraSensível	Resistência Genotípica aos Antivirais
Limite de Detecção	10 cópias/mL	400 cópias/mL	40 cópias/mL	1000 cópias/mL
Linearidade	-	400 a 750.000 cp/mL	40 a 100.000 cópias/mL	-
Preparo do Paciente	Não é necessário nenhum preparo especial.	Não é necessário nenhum preparo especial.	Não é necessário nenhum preparo especial.	Não é necessário nenhum preparo especial.
Tipo de Amostra	Sangue total em EDTA.	Plasma colhido em EDTA	Plasma colhido em EDTA.	Sangue total em EDTA
Preparo da Amostra	Centrifugar e congelar o tubo na posição vertical. Enviar congelado	Centrifugar e separar o plasma em até 6 horas após a coleta. Manter e enviar congelado.	Centrifugar e separar o plasma em até 6 horas após a coleta. Manter e enviar congelado.	Centrifugar e congelar o tubo na posição vertical. Enviar congelado