



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HIV

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Comparação do desempenho da metodologia *Real Time PCR* para
quantificação da carga viral do HIV-1 em amostras de sangue
aplicadas em papel de filtro (DBS) e plasma**

Priscilla Lopes da Silva Guimarães

RIO DE JANEIRO

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HIV

**Comparação do desempenho da metodologia *Real Time PCR*
para quantificação da carga viral do HIV-1 em amostras de
sangue aplicadas em papel de filtro (DBS) e plasma**

Priscilla Lopes da Silva Guimarães

Sob a Orientação do Professor
Dr. Walter de Araujo Eyer-Silva

e Co-orientação da Professora
Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Infecção
HIV/AIDS e Hepatites Virais na
área de HIV

Rio de Janeiro

2018

G963 Guimarães, Priscilla Lopes da Silva
Comparação do desempenho da metodologia Real Time
PCR para quantificação da carga viral do HIV-1 em
amostras de sangue aplicadas em papel de filtro
(DBS) e plasma / Priscilla Lopes da Silva
Guimarães. -- Rio de Janeiro, 2018.
83 f.

Orientador: Walter de Araújo Eyer-Silva.
Coorientadora: Sylvia Lopes Maia Teixeira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais, 2018.

1. HIV-1. 2. Carga Viral (CV). 3. DBS. I. Eyer-
Silva, Walter de Araújo, orient. II. Teixeira,
Sylvia Lopes Maia, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV

Priscilla Lopes da Silva Guimarães

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais na Área de HIV

DISSERTAÇÃO APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 07/03/2018.

Prof. Dr. Walter de Araujo Eyer-Silva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO.

Profa. Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ.

Prof. Msc. Luiz Claudio Pereira Ribeiro.
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO.

Profa. Dra. Livia Melo Villar.
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ.

Profa. Dra. Fabiana Barbosa Assumpção de Souza
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO(Suplente).

Profa. Dra. Fernanda Heloíse Côrtes
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ(Suplente).

DEDICATÓRIA

Agadeço imensamente e todos os dias a Deus, por me permitir realizar um sonho e me guiar por ele!

Aos os meus pais Nemilda e Nilson por todos os ensinamentos, pela lições de vida, por me proporcionarem sempre toda a possibilidade de conhecimento com muito esforço e dedicação. Serei sempre grata por tudo!!!!

Ao meu marido Paulo por sempre me motivar, me ajudar, entender as ausências nos finais de semana sempre me fazendo acreditar que eu seria capaz.

A Amora pela companhia deitadinha ao meu lado desde o primeiro momento, e pelo seu amor.

A Surpresinha que Deus me proporcionou agora na reta final do mestrado (Alícia)!

AGRADECIMENTOS

A Dra. Mariza Morgado por confiar no meu trabalho e me deixar fazer parte desse laboratório, o qual tenho muito orgulho de fazer parte.

A Dra. Monick Lindenmeyer por me permitir subir mais um degrau da minha carreira, pelo respeito e carinho em todos os momentos.

Ao Dr. Walter meu orientador que confiou em mim no primeiro momento que conversamos.

A Dra. Sylvia minha orientadora, por sempre acreditar, entender as minhas dificuldades e puxar o melhor de mim, sempre respeitando os meus limites.

A Dra. Neilane Bertoni, que colaborou muito com os resultados estatísticos aqui apresentados.

A todos os membros do LabAids com quem eu pude conviver desde 2009, por todo o conhecimento que me é passado dia a dia. Em especial à Bianca, Carlos, Diogo, Fernanda, Michelle, Nathália, Thaysse que ouviram minhas lamentações, meus medos e ajudaram da maneira que podiam me tranquilizando quando eu achava que o problema era eu! Rs. Obrigada por todos os bons momentos sempre!

Aos meus amigos da pós-graduação Leonardo Areias, Gladys D'Acri e Juliana Rangel por todos os momentos de risadas e desabafos.

A empresa Abbott representada pelos assessores científicos Daniela Ribeiro, Gustavo Lacerda e Marcos Junior por ajudar com o material do DBS e pelo suporte em todos os momentos em que precisei.

Aos professores da pós-graduação do HUGG-UNIRIO por todo o ensinamento.

“Negar a ciência é muito mais fácil do que aprendê-la”

Mario Bunge

RESUMO

A determinação da carga viral (CV) plasmática do HIV-1 é de grande importância para o monitoramento do curso da doença (aids), e sua mensuração periódica contribui também para a compreensão da história natural da infecção, da evolução e do prognóstico da doença. Em algumas regiões geográficas há dificuldades tanto no acesso a postos para coleta de sangue como no processamento e armazenamento do material biológico. Nesse contexto, o uso do DBS (*Dried Blood Spot*) para coleta de sangue constitui uma alternativa facilitadora para países com recursos limitados e locais de difícil acesso. O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade do emprego do DBS para quantificação da carga viral do HIV-1 em amostras clínicas, inicialmente para uso no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do IOC/FIOCRUZ. Para isso, foi empregada a metodologia de Real Time PCR, utilizando as plataformas da Abbott m2000sp para extração e m2000rt para quantificação do RNA viral, respectivamente. Para as amostras coletadas em DBS foi realizada uma etapa prévia de tratamento com um tampão específico antes da extração do RNA viral. Análises exploratórias e estatísticas dos resultados foram realizadas. A padronização do protocolo já estabelecido para quantificação da CV plasmática pela empresa Abbott para uso com DBS foi realizada com sucesso. Do total de 92 amostras estratificadas em faixas distintas (A, B, C e D) de acordo com as quantificações de CV plasmáticas e em DBS, 80% apresentaram concordância entre as faixas de CV e, quando avaliadas separadamente, 85% apresentaram valores comparáveis, considerando-se a diferença de $0,5\log_{10}$. Os valores de CV no plasma e no DBS mostraram-se correlacionados ($R^2 = 0.92$; coeficiente de correlação de Pearson = 0.924). Da mesma forma, foi observada uma boa concordância entre os métodos (diferença média = $-0.22 \log_{10}$). Um Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de PCR em tempo real para detecção da CV do HIV-1 a partir de DBS foi desenvolvido com sucesso para uso, inicialmente, no Laboratório de Aids & Imunologia Molecular do IOC/FIOCRUZ.

Palavras-chave: HIV-1, Carga Viral (CV), DBS.

ABSTRACT

The determination of HIV-1 plasmatic viral load (VL) is of great importance for monitoring the course of the disease (AIDS), and its periodic measurement also contributes for the understanding of the natural history of the infection, the evolution and the prognosis of the disease. In some geographic regions, there are difficulties both in the access to blood collection stations as in the processing and storage of biological material. In this context, the use of DBS (*Dried Blood Spot*) for blood collection constitutes a facilitating alternative for countries with limited resources and hard to reach places. The aim of the present study was to evaluate the feasibility of using DBS for HIV-1 VL in clinical samples, initially for use in the Laboratory of AIDS & Molecular Immunology of IOC/FIOCRUZ. To this end, the Real Time PCR methodology was employed, using the Abbott m2000sp and m2000rt platforms for viral RNA extraction and quantification, respectively. For samples collected in DBS a previous treatment step with a specific buffer was performed before the viral RNA extraction. Exploratory and statistical analyzes of the results were performed. The standardization of the previously established protocol for plasmatic VL quantification by Abbott for use with DBS was performed successfully. Out of the 92 samples stratified in different VL categories (A, B, C and D) according to plasmatic and DBS VL quantifications, 80% showed concordance between VL categories and, when evaluated separately, 85% had similar values, considering the difference of 0.5 log₁₀. Plasmatic and DBS VL quantifications were correlated ($R^2 = 0.92$; Pearson's correlation coefficient = 0.924). In the same way, a good agreement between the methods was observed (mean difference = -0.22 log¹⁰). A Standard Operating Procedure (SOP) of the Real Time PCR technique for HIV-1 VL detection from DBS was successfully developed for initial use at the Laboratory of Aids & Molecular Immunology of IOC/FIOCRUZ.

Keywords: HIV-1, Viral Load (VL), DBS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática dos tipos, grupos, subtipos, subsubtipos e formas recombinantes do HIV-1	18
Figura 2. Esquema da partícula madura do HIV-1 destacando as camadas estruturais, assim como as proteínas e enzimas que a compõem (transcriptase reversa, protease e integrase).....	19
Figura 3. Esquema do ciclo replicativo do HIV-1	21
Figura 4. Esquema do genoma proviral do HIV-1, com as proteínas codificadas pelos genes GAG, POL e ENV.....	22
Figura 5. Curso natural e típico de infecção pelo HIV	24
Figura 6. DBS antes (A) e após (B) a dispensação do sangue total.....	36
Figura 7. Plataformas de extração (m2000sp) e amplificação (m2000rt) da carga viral.....	367
Figura 8. Distribuição de cargas virais (\log_{10}) das amostras de DBS70 e DBS100 ..	42
Figura 9. Gráfico de correlação entre os resultados das quantificações de CV a partir do plasma e do DBS.	47
Figura 10. Análise de concordância entre os métodos de quantificação de CV do HIV-1 utilizando plasma e DBS.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Levantamento dos estudos já realizados empregando a quantificação da CV em DBS	29
Tabela 2 – Faixas de carga viral selecionadas para o estudo em cópias/ml e \log_{10}	34
Tabela 3 – Resultados das quantificações de carga viral plasmática, em DBS70 e em DBS100 das 7 amostras empregadas na comparação do ensaio.....	41
Tabela 4 – Distribuição das amostras de acordo com as faixas de carga viral plasmática e em DBS utilizadas no estudo.....	43
Tabela 5 – Resultados de CV plasmática e DBS em cópias e log de todas as amostras incluídas no estudo	44
Tabela 6 – Resultados de CV plasmática e em DBS (\log_{10}) das amostras cujos valores foram discordantes	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação entre as metodologias para quantificação da CV do HIV-1já empregadas na Rede Nacional de Carga Viral	26
---	----

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
b-DNA	Branched DNA
CA	Capsídeo
CCR5	Receptor de alfa-quimiocinas 5
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CI	Controle Interno
cp/mL	Cópias por mililitro
CRF	Forma Recombinante Circulante
CV	Carga Viral
CXCR4	Receptor de beta-quimiocinas 4
DBS	Dried Blood Spot
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>ENV</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAG	Gene do grupo antígeno do HIV
gp120	Glicoproteína de 120 Kd
gp41	Glicoproteína de 41 Kd
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IN	Integrase
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
kDa	kilodalton
Kb	Kilobase

log	Logaritmo
LTR	Terminações Longas Repetidas
MA	Matriz
NC	Nucleocapsídeo
NASBA	Amplificação baseada na sequência de ácido nucléico
pb	Pares de base
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Células Mononucleares Do Sangue Periférico)
<i>POL</i>	Gene da polimerase do HIV
P17	Proteína 17
P24	Proteína 24
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/Aids
qRT-PCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase H	Ribonuclease H
RT	Transcriptase reversa
qRT-PCR	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
TCD4+	Linfócitos TCD4
UNAIDS	Programa das Nações Unidas no combate ao HIV/Aids
URF	Forma Recombinante Única

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Epidemiologia do HIV/AIDS	15
1.2 Classificação do HIV	17
1.3 Características estruturais, ciclo replicativo e genoma do HIV-1	18
1.4 História natural da infecção pelo HIV-1	23
1.5 Monitoramento laboratorial da infecção pelo HIV através da quantificação da carga viral e a Rede Nacional de Carga Viral.....	24
1.6 Uso do papel de filtro (<i>Dried Blood Spot</i> , DBS) para quantificação da carga viral.....	27
2. Justificativa	31
3. Objetivos	33
4. Metodologia	34
4.1 Casuística	34
4.2 Processamento das amostras.....	35
4.3 Quantificação de Carga Viral	36
4.4 Extração e amplificação do RNA viral.....	36
4.5 Análises estatísticas	38
5. Resultados	40
5.1 Padronização da extração das amostras coletadas em DBS	40
5.2 Comparação dos resultados de CV em DBS com diferentes volumes inicialmente utilizados	40
5.3 Distribuição dos resultados das quantificações de CV plasmática <i>versus</i> em DBS.....	41
5.4 Análises de correlação e de concordância entre as quantificações de CV plasmática <i>versus</i> em DBS	47
6. Discussão	49

7. Conclusões	53
8. Perspectivas	54
9. Referências.....	55
ANEXOS	63
ANEXO A - Quantificação de Carga Viral do HIV-1 por PCR RealTime na plataforma Abbott m2000sp / m2000rt utilizando sangue seco em papel de filtro (DBS).....	64

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do HIV/AIDS

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) (Coffin *et al.*, 1986; Monteiro *et al.*, 2009), é considerado um dos patógenos de maior relevância das últimas décadas. A pandemia do HIV é altamente heterogênea, estruturada em sub-epidemias influenciadas por fatores biológicos, comportamentais e culturais. Desde sua identificação no início dos anos 80 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo, 1984), mais de 80 milhões de indivíduos em todo o mundo já foram infectados pelo HIV-1, dos quais cerca de 38 milhões foram a óbito, fazendo deste, o patógeno de maior impacto do último século (Unaid, 2015).

Dados do último relatório do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids revelam que em 2016 havia aproximadamente 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV no mundo, e 1 milhão de óbitos relacionados ao HIV. Nesse mesmo ano, foram registrados cerca de 1,8 milhões (1,6 milhão – 2,1 milhões) de novos casos no mundo, mostrando uma diminuição em relação a 2000, que registrou 3,2 milhões, correspondendo a uma queda de 43,7% (Ministério Da Saúde, 2017). Registrou-se uma cobertura de 46% (43 – 50%) de pessoas infectadas em uso de terapia antirretroviral, o que está relacionado a um declínio de 26% das mortes relacionadas à aids no mundo. A falta de conhecimento de pessoas infectadas pelo HIV-1 quanto aos benefícios do uso da terapia antirretroviral é um grande problema, já que indivíduos que não fazem uso da terapia antirretroviral estão mais propícios à progressão para a aids e são potenciais transmissores do vírus, contribuindo assim para o aumento do número de indivíduos infectados pelo HIV. Dados da UNAIDS apontam que, em 2016, havia 19,5 milhões de pessoas com acesso à terapia antirretroviral no mundo, correspondendo a cerca de 53% do número de pessoas que deveriam estar em uso da terapia (Unaid, 2017).

Em 2014 o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids (UNAIDS) lançou o documento “Acabando com a AIDS: progresso rumo às metas 90–90–90”, com intuito de acelerar o progresso da resposta ao HIV, de modo que, até 2020, 90% de todas as pessoas vivendo com HIV conheçam seu estado sorológico positivo para o vírus, 90% de todas essas pessoas diagnosticadas com HIV tenham acesso ao tratamento antirretroviral, e que 90% de todas as pessoas em tratamento tenham carga viral (CV) indetectável (Unaid, 2017). Desta forma, estima-se que nos próximos anos haja a ampliação da cobertura de oferta de medicamentos antirretrovirais devido à emergência de novas políticas de saúde pública, as quais incluem a oferta de tratamento a populações chave como medida profilática, o que diminuiria a probabilidade de infecção segundo alguns estudos (Cohen *et al.*, 2011; Thigpen *et al.*, 2012; Choopanya *et al.*, 2013), e a indivíduos independentemente do estágio da doença e dos níveis de células TCD4+, visto que o início precoce da terapia tem sido associado com melhores desfechos clínicos na fase crônica da doença (Okulicz *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2016).

No Brasil, existem 882.810 mil pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), considerando-se o período de 1980 até junho de 2017. Até junho de 2016, no Brasil, havia 842.535 casos acumulados de aids, sendo que, somente no ano de 2016 foram registradas 12.682 mil novas infecções pelo HIV e 12.298 mortes relacionadas à aids. Outro dado relevante é que segundo o boletim epidemiológico brasileiro, houve um registro de 316.088 pessoas que vieram a óbito, desde o início da epidemia até dezembro de 2016 (Ministério Da Saúde, 2017). Esta redução é atribuída ao sucesso da terapia antirretroviral e ao diagnóstico precoce da infecção e doença, aumentando assim a expectativa de vida do indivíduo infectado. A epidemia brasileira tem sido classificada como estável, com uma prevalência de 0,6% na população adulta (Ministério Da Saúde, 2016). Somente no ano de 2016, segundo o relatório da UNAIDS, 48 mil novas infecções e 14 mil óbitos foram registrados (Unaid, 2017).

No Brasil, a epidemia se concentra em grande parte entre as seguintes populações-chave: usuários de drogas injetáveis, profissionais do sexo e homens que fazem sexo com homens. Com relação à faixa etária, nos últimos 10 anos houve

uma mudança no perfil de idade dos novos casos de infecção pelo HIV reportados. Há mais registros em homens e mulheres mais jovens, tendo em vista que os dados anteriores vinham registrando um maior número de casos entre pessoas na faixa etária entre 30 a 50 anos e mais recentemente os dados apontam para o aumento do número de casos entre jovens de 20 a 29 anos (Ministério Da Saúde, 2016). É importante enfatizar que o Brasil continua sendo uma referência entre países em desenvolvimento por oferecer acesso gratuito aos medicamentos antirretrovirais para os indivíduos infectados, e por implementar um programa de redução de danos com medidas preventivas como a distribuição de preservativos e seringas, além de campanhas de conscientização da população. Como resultado dessas políticas de prevenção, as taxas de transmissão do vírus reduziram, assim como a mortalidade, o que contribui para o controle da epidemia e para o aumento da expectativa de vida das PVHA no país (Unaid, 2017).

1.2 Classificação do HIV

Existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 encontra-se bem distribuído pelo mundo, sendo considerado o principal responsável pela pandemia de HIV/aids. Já o HIV-2 é menos disseminado, restrito à região oeste do continente africano e está associado a um menor grau de infecciosidade e virulência (Sharp e Hahn, 2011). O HIV-1 foi classificado em quatro grupos: M (*Major*, majoritário), O (*Outlier*), N (Novo, não-M e não-O) e P (*Pan trogodytestroglodytes*). O grupo M é o mais prevalente no mundo, e devido a sua variabilidade genética, é classificado filogeneticamente em nove subtipos: A-D, F-H, J e K (Robertson *et al.*, 2000). Os subtipos A e F são ainda subdivididos em sub-subtipos: A1-A5 e F1-F2 (Meloni *et al.*, 2004). Além dos vários subtipos virais, os eventos de recombinação entre os diferentes subtipos levam a geração de formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) (Figura 1). Tanto para a descrição de um CRF como para um grupo ou subtipo, é necessário que sejam sequenciados pelo menos três genomas completos de vírus obtidos de

indivíduos não relacionados epidemiologicamente. Quando temos um novo CRF, essas três sequências devem apresentar o mesmo padrão de recombinação ao longo do genoma (Robertson *et al.*, 2000). Os URFs também são formas recombinantes entre subtipos, porém, são encontrados em apenas um indivíduo infectado (Revisto por (Hemelaar *et al.*, 2011).

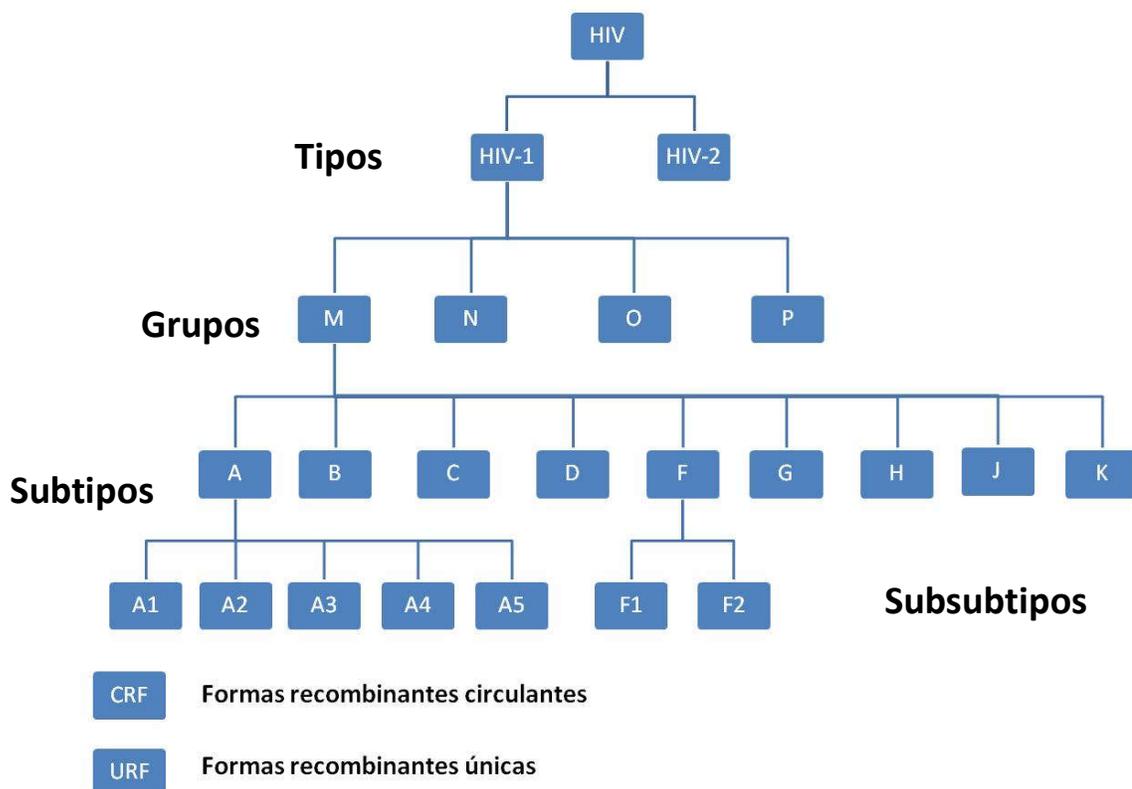


Figura 1. Representação esquemática dos tipos, grupos, subtipos, subsubtipos e formas recombinantes do HIV-1. Adaptado de (Robertson *et al.*, 2000)

1.3 Características estruturais, ciclo replicativo e genoma do HIV-1

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, a qual possui a enzima transcriptase reversa capaz de retrotranscrever seu genoma de RNA em DNA; e ao

gênero *Lentivirus* que se caracteriza pelo longo tempo entre a infecção e o aparecimento de sintomas (revisto por Roquebert *et al.*, 2009).

O HIV possui um genoma constituído de duas fitas de RNA similares de polaridade positiva, sendo esta uma característica comum entre os retrovírus, cada uma com aproximadamente 9,7kb, contendo sequências que codificam as diversas proteínas virais (revisto por Goto *et al.*, 1994). A partícula viral madura apresenta simetria icosaédrica, com aproximadamente 110nm de diâmetro, apresentando um envoltório lipoprotéico denominado envelope, constituindo a camada mais externa do vírus, que se origina através da bicamada lipídica da célula hospedeira durante o brotamento dos vírions, apresentando também em sua estrutura as glicoproteínas gp120 e gp41 (Figura 2).

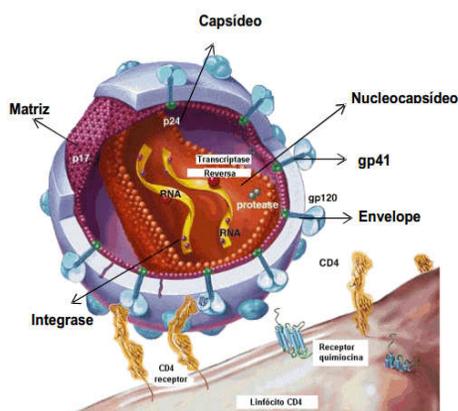


Figura 2. Esquema da partícula madura do HIV-1 destacando as camadas estruturais, assim como as proteínas e enzimas que a compõem (transcriptase reversa, protease e integrase). Fonte: <http://celulando.blogspot.com>

As glicoproteínas são codificadas pelo gene do envelope (*ENV*) e desempenham assim um importante papel nas etapas de adsorção, fusão membranar e posterior entrada na célula hospedeira (Goto *et al.*, 1994; revisto por Goto *et al.*, 1998). Na parte interna do envelope viral, encontramos a matriz (MA) formada pela proteína p17, a qual é codificada pelo grupo antígeno específico do gene *GAG*. Essa proteína é essencial para a integridade do vírion e participa na maturação da partícula viral pela incorporação das glicoproteínas do envelope no vírion maduro (Hoffmann *et al.*,

2017). O capsídeo viral (CA) apresenta forma cônica sendo constituído pela proteína p24 (Marx *et al.*, 1988). Envoltos pelo capsídeo encontram-se o nucleocapsídeo (NC), as enzimas virais (protease, transcriptase reversa e integrase) e as proteínas acessórias, as quais estão intimamente ligadas às duas fitas de RNA.

O ciclo replicativo do HIV-1 é do tipo lisogênico, não havendo o rompimento da membrana da célula pelo vírus no momento em que ocorre o brotamento do mesmo, tendo assim uma parte da membrana plasmática do indivíduo infectado carregada para formar o envelope viral. A replicação do HIV-1 ocorre por uma série de eventos que ocorrem de forma simultânea (Freed, 2001). O processo de entrada na célula hospedeira se dá pela adsorção das partículas virais na superfície de células do sistema imunológico que expressam o receptor CD4 (linfócitos TCD4+, monócitos, macrófagos e células dendríticas), através da interação da glicoproteína do envelope viral gp120 com este receptor. Além da molécula CD4, a gp120 reconhece e se associa a receptores de quimiocinas, CCR5 (expresso em macrófagos e células dendríticas) e/ou CXCR4 (expresso em células T), que servem como correceptores para a entrada do vírus na célula (Clapham e Weiss, 1997). Após essas ligações, ocorrem mudanças conformacionais nas proteínas gp120 e gp41, levando a exposição dessa última, com subsequente fusão entre o envelope viral e a bicamada lipídica da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus na célula (Sattentau *et al.*, 1993; Manavi, 2006; Blumenthal *et al.*, 2012)

Após a fusão entre o envelope viral com a membrana da célula hospedeira, ocorre o desnudamento do vírus com inserção do capsídeo viral no citoplasma celular, resultando assim na liberação do genoma viral associado às enzimas virais ativas, denominadas protease, transcriptase reversa e integrase, dando início ao ciclo de replicação viral (Freed, 2001). A transcriptase reversa transcreve o RNA viral promovendo a síntese de molécula de DNA a partir do RNA viral. A transcriptase reversa é uma enzima multifuncional que apresenta tanto a atividade de DNA polimerase dependente de DNA assim como de RNA, bem como de ribonuclease H (RNase H), a qual atua na formação da molécula híbrida RNA/DNA, por meio da clivagem específica da fita de RNA viral. O DNA proviral será transportado até o núcleo celular, onde será integrado ao genoma da célula infectada pela ação da

integrase (Gotte *et al.*, 1999; Sherman e Greene, 2002). A integração é um passo essencial na replicação e, conseqüentemente, para persistência da infecção (Wu *et al.*, 1999; Reinke *et al.*, 2001). A partir dessa integração, o genoma viral passa a ser denominado provírus, o qual pode ser manter em estado latente até que seja ativado por um evento mitogênico, ocorrendo assim a síntese de proteínas após a transcrição do RNA viral, havendo a liberação de novas partículas virais que sofrerão a ação da enzima protease, responsável pela maturação dessas partículas (Freed, 2001) (Figura 3).

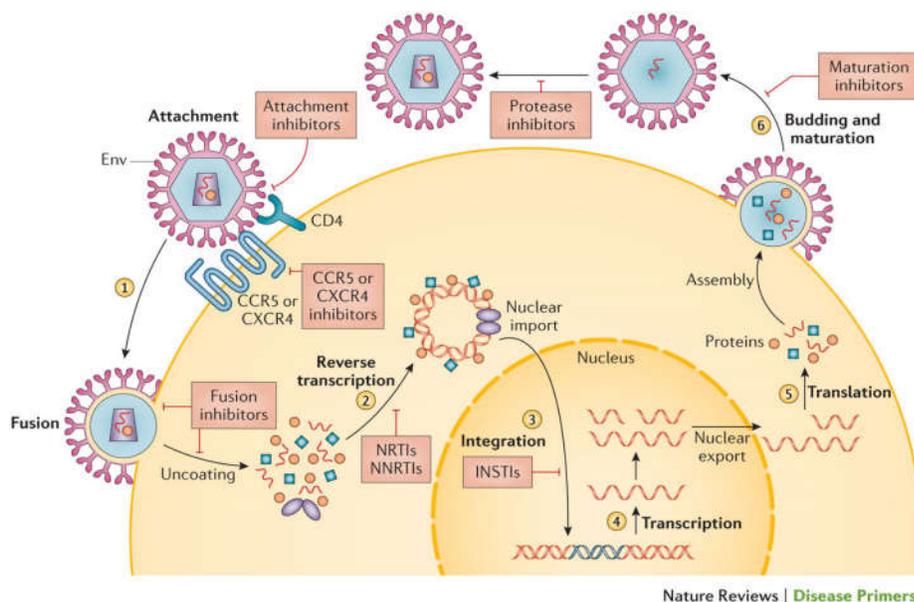


Figura 3. Esquema do ciclo replicativo do HIV-1. Fonte: Adaptado de (Brenchley *et al.*, 2006)

O genoma do HIV apresenta nove genes que expressam proteínas não estruturais regulatórias, sendo estes: *GAG*, *ENV* (que codificam proteínas estruturais) e *POL* (o qual codifica as enzimas virais que são comuns a todos os retrovírus); *TAT* e *REV* (genes regulatórios) e *VIF*, *VPR*, *VPU* e *NEF* (genes acessórios) (Figura 4). Na extremidade 3' e 5' do genoma proviral do HIV são encontradas repetições terminais longas, denominadas de LTR (*Long Terminal Repeats*), onde estão localizadas as principais sequências promotoras para a transcrição dos genes virais (Cherrington e Ganem, 1992); revisto por (Freed, 2001).

1.4 História natural da infecção pelo HIV-1

A aids foi descrita pela primeira vez na década de 1980, como uma doença que se caracterizava por uma profunda imunossupressão, causada pelo HIV. Esta infecção ocorre através do contato de um indivíduo não infectado com o sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectado.

Abaixo, podemos observar o curso clínico da doença em ausência do uso de terapia antirretroviral, caracterizando-se por 3 fases, sendo a primeira denominada fase aguda, na qual ocorre um pico de viremia que se dá de 3 – 6 semanas após a infecção pelo vírus (Figura 5) (Ministério Da Saúde, 2016). Na fase de latência, passa a ocorrer um aumento de células TCD4+, e a diminuição da carga viral no indivíduo atingindo o *set point* viral, o qual ocorre uma estabilização da carga viral após um período de infecção aguda pelo HIV. O *set point* viral ocorre depois que o sistema imune desenvolveu células T citotóxicas específicas e começa a tentar combater o vírus. O *set point* viral não é fixo e constante, variando para cada indivíduo. A fase de aids, se instala no indivíduo infectado quando, além do aumento de CV, há também uma queda brusca dos níveis de TCD4+ circulantes no sangue do paciente, deixando seu organismo vulnerável a outras doenças oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas levando até mesmo a morte, caso não haja tratamento, tendo em vista que o organismo do indivíduo infectado não tem como responder frente a qualquer nova infecção (Cohen *et al.*, 1997; Cohen e Weisman, 1999) revisto por (Alcamí e Coiras, 2011).

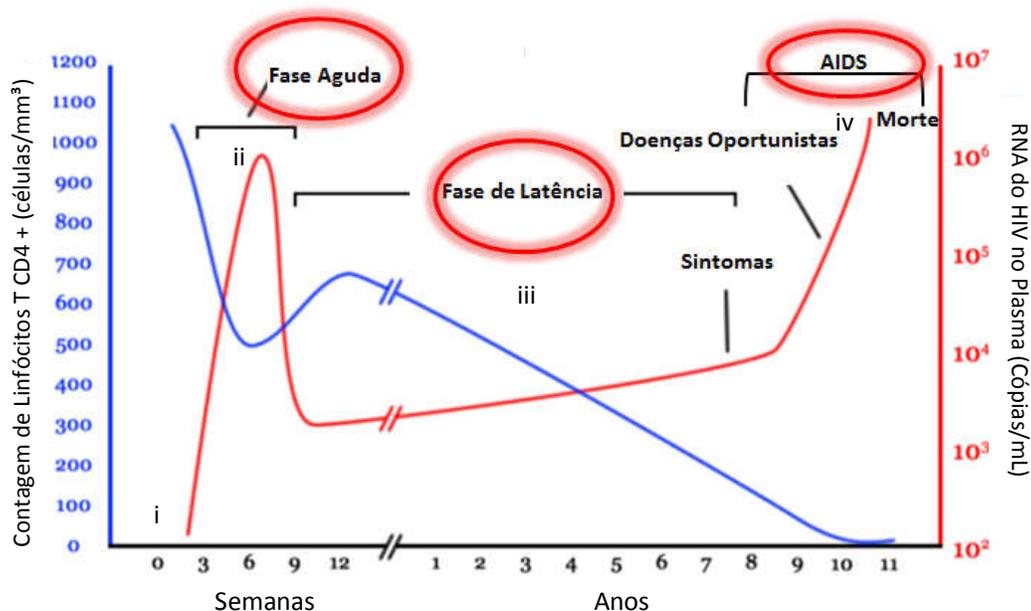


Figura 5. Curso natural e típico de infecção pelo HIV. (i) indivíduo infectado com HIV-1; (ii) Fase aguda com duração de 6-12 semanas com pico da CV e queda nas células T CD4 +; (iii) Fase de latência pode durar de 7-10 anos; Após a fase aguda, a replicação viral atinge um nível constante conhecido como *set point*; (iv) O início da aids está associado ao aumento da replicação viral e o declínio das células CD4 + diminui para $<200 / \text{mm}^3$; O tempo para o início da aids varia em indivíduos podendo ocorrer de 2 anos a mais de 15 anos após a soroconversão. (Adaptado de An e Winkler, 2010).

1.5 Monitoramento laboratorial da infecção pelo HIV através da quantificação da carga viral e a Rede Nacional de Carga Viral

Com intuito de implementar e desenvolver uma política nacional de controle das IST/aids no Brasil, em 1986 foi criado o Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, que teve um papel importante em ações que tentavam diminuir a doença através de uma política pública que fornecia medicação gratuita, vindo posteriormente a se tornar uma referência mundial no tratamento da Aids (Monteiro *et al.*, 2009). O Departamento propunha melhorar a qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV, através de ações de assistência, prevenção e monitoramento da doença, desde o diagnóstico até o tratamento dos pacientes, junto à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Seus objetivos atuais são: reduzir a transmissão do HIV, das infecções sexualmente transmissíveis

e das hepatites virais e melhorar a qualidade de vida das pessoas portadoras dessas doenças (Monteiro *et al.*, 2009).

Foram então adotadas políticas para a ampliação do diagnóstico, sendo os primeiros testes imunoenzimáticos chamados de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com alta especificidade e sensibilidade. Com a introdução de novas metodologias foram desenvolvidos novos imunoenaios os quais foram desenvolvidos de acordo com a evolução das metodologias empregadas a partir do ELISA (Ministério da Saúde, 2013b). A determinação da CV plasmática é de grande importância no monitoramento da infecção pelo HIV, quantificando os vírus que estão sendo produzidos e lançados na corrente sanguínea (Ministério Da Saúde, 2001). A determinação da CV com exatidão e precisão auxilia na compreensão da história natural da infecção pelo HIV, da evolução e prognóstico da infecção e na avaliação da resposta aos esquemas terapêuticos instituídos, uma vez que reflete a dinâmica da infecção (Mellors *et al.*, 1996).

Atualmente, a Rede Nacional de Carga Viral, coordenada pelo Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/aids e das Hepatites virais do Ministério da Saúde, conta com 84 laboratórios credenciados para a realização de exames de carga viral e disponibiliza testes laboratoriais com regularidade a cada três meses para monitoramento do curso clínico da doença nos indivíduos sorologicamente testados. Tal estratégia permite, ainda, verificar a ocorrência de falha virológica e/ou falha terapêutica, visto que uma adesão inadequada ao tratamento antirretroviral pode fazer com que o vírus desenvolva resistência aos medicamentos existentes, tornando-se necessário, nestes casos, utilizar uma terapia de resgate (Ministério Da Saúde, 2015). De acordo com a Portaria Nº 59/GM/MS, de 29 de janeiro de 2003 (Ministério Da Saúde, 2003), o exame de quantificação da CV tem um papel importante para crianças de até 18 meses de vida, pois em função da transferência passiva de anticorpos da mãe para o bebê, utilizam-se testes para quantificação da CV do HIV-1 como diagnóstico. Há também junto ao Ministério da Saúde a recomendação do exame de CV como auxiliar no diagnóstico nos casos em que o médico suspeita de infecção aguda pelo HIV, já que a sorologia para o rastreamento do HIV é geralmente negativa nessa fase. No intervalo de tempo

compreendido entre as primeiras semanas da infecção pelo HIV até o aparecimento dos anticorpos anti-HIV (soroconversão), bilhões de partículas virais são produzidas diariamente, a viremia plasmática alcança níveis elevados e o indivíduo torna-se um potencial transmissor do HIV (Ministério Da Saúde, 2013a).

Durante os 20 anos de existência da Rede Nacional de Carga Viral no Brasil, a qual foi criada em 1998, três metodologias distintas foram utilizadas pelos laboratórios participantes da rede: (1) *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA), de 1997 a 2007, (2) *Branched DNA* (b-DNA), de 2007 a 2013 e (3) *Real Time PCR* (qRT-PCR), de 2013 até o momento (Quadro 1). O NASBA (Biomérieux, França) é um procedimento que consiste em uma reação de amplificação isotérmica que utiliza sondas e *primers* específicos e otimizados. O b-DNA (Siemens, Alemanha) é um procedimento de hibridização tipo sanduíche do ácido nucléico para a quantificação direta do RNA do HIV-1 no plasma humano. O RealTime PCR (Abbott, Estados Unidos) é um teste que envolve a transcrição reversa seguida de amplificação por PCR. Atualmente, o exame de quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 emprega a metodologia Real Time PCR (plataforma m2000), sendo executado por todos os laboratórios de CV integrantes da Rede Nacional de Carga Viral do Departamento Nacional de IST/Aids e Hepatites virais.

**QUADRO 1 – COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DA CV DO HIV-1 EMPREGADAS NA REDE NACIONAL DE
CARGA VIRAL.**

	Fabricantes		
	Biomérieux	Siemens	Abbott
Metodologia	NASBA	b-DNA	RealTime PCR
Tipo de Amostra (Material)	Soro e Plasma	Plasma	Plasma
Região Genômica utilizada	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>pol</i>
Faixa de detecção (cp/mL)	80 a 10.000.000	50 a 500.000	40 a 10.000.000
Grupos detectados	Grupo M	Grupo M	Grupo M; Grupo N
Subtipos/recombinants detectados	Subtipos A,B, C, D,F,H	Subtipos A, B,C, D, F,G	Subtipos A, B, C, D,G,H, CRF01-AE, CRF02-AG
Volume de amostra utilizado (mL)	1,0	1,0	0,6
Tempo de execução do ensaio	1h 30 min	28 horas	7 horas
Quantidade de testes por análise	30	168	93
Especificidade	100,00%	97,60%	99,50%
Automatização	Sim	Parcial	Sim

1.6 Uso do papel de filtro (*Dried Blood Spot, DBS*) para quantificação da carga viral

Empregou-se pela primeira vez o DBS para realização de exames laboratoriais para determinação da presença de fenilalanina e fenilcetonúria em recém-nascidos pelo grupo coordenado pelo Dr. Robert Guthrie, em 1963, na Escócia (Figueiró-Filho *et al.*, 2005). No Brasil, essa técnica se tornou conhecida em alguns laboratórios na década de 80, quando tornou-se obrigatório a triagem neonatal (“teste do pezinho”).

No contexto da mensuração periódica de CV plasmática do HIV no monitoramento do curso clínico da doença, deve-se levar em conta que existem localidades com distância considerável entre o local de residência dos indivíduos infectados pelo HIV e o local onde são realizadas a coleta e armazenagem de sangue, dificultando a realização dos exames de CV com a devida periodicidade. Outra questão que implica negativamente em locais sem estrutura é a necessidade de geladeiras e freezers para armazenagem do material coletado até a hora da realização do exame. O alto custo de se manter um laboratório ou até mesmo a logística de envio dessas amostras para os locais que executam o exame de CV fazem com que muitos pacientes não tenham acesso à realização do exame para devido monitoramento do curso clínico da infecção pelo HIV. Frente a esses fatores e visando minimizar essas dificuldades, o uso do DBS tem sido apontado em diversos estudos - principalmente em regiões do continente africano - como apropriado para coleta de material biológico e tem se mostrado uma ferramenta facilitadora para a quantificação da CV nesses locais mais afastados (Brambilla *et al.*, 2003; Alvarez-Munoz *et al.*, 2005; Uttayamakul *et al.*, 2005; Lofgren *et al.*, 2009; Andreotti *et al.*, 2010; Benedicto *et al.*, 2017).

De acordo com um relatório recente divulgado pelo programa Médicos Sem Fronteiras, em Uganda há uma dificuldade ao acesso a testes de CV de HIV (Médecins Sans Frontières, 2013). Isso se dá pelo alto custo e pela complexidade da coleta de sangue, sendo necessário dispor de pessoas treinadas e locais apropriados para armazenamento das amostras, o que na maioria das vezes são fatores cruciais, agregados à necessidade de formação de recursos humanos e

infra-estrutura de laboratório. Há neste país uma forte recomendação de que a CV seja a abordagem de monitoramento preferencial para diagnosticar e confirmar a falha terapêutica (Balinda *et al.*, 2016). Um estudo prévio realizado neste mesmo país indicou que o DBS constitui uma alternativa prática para substituição do plasma, já que há estudos relatando que as amostras em DBS são mantidas estáveis, havendo uma facilidade na coleta, no armazenamento e transporte das mesmas (Hamers *et al.*, 2009).

Há diversas marcas de testes diferentes para a quantificação da CV do HIV-1 disponíveis no mercado, tais como: Real time PCR (Abbott), que emprega a metodologia de PCR em tempo real; Cobas Amplicor (Roche), que consiste em um PCR qualitativo *in vitro* e Nuclisens easyQ (Biomérieux), primeiro sistema automatizado que combina a amplificação NASBA com a detecção do RNA em tempo real, criando possibilidades de se optar por kits com valores mais baixos (Cassol *et al.*, 1997; Mbida *et al.*, 2009; Bertagnolio *et al.*, 2010). A Tabela 1 apresenta um panorama dos estudos já realizados empregando a quantificação da CV em DBS, bem como a estratégia metodológica utilizada.

TABELA 1 – LEVANTAMENTO DOS ESTUDOS JÁ REALIZADOS EMPREGANDO A QUANTIFICAÇÃO DA CV EM DBS

População	N.	Local	Técnica empregada	Referência bibliográfica
Pacientes infectados pelo HIV-1	103	Madri – Espanha	NuclisensEasyQ	Garrido, C.; 2009
Crianças até 18 meses expostas à infecção pelo HIV-1	375	Nordeste da Tanzânia	Abbott RealTime e ROCHE COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan System	Lofgren, S., 2009
Indivíduos entre 18 -60 anos infectados pelo HIV-1	125	Índia	Abbott RealTime	Neogi, U.;2012
Adultos infectados pelo subtipo B do HIV-1	157	Madri – Espanha	Abbott RealTime	Arredondo, M.; 2012
Pacientes infectados pelo HIV-1 em uso de ART	547	Malawi	Abbott RealTime	Rutstein, S.; 2014
Pacientes infectados pelo HIV-1 provenientes de 20 centros de tratamento	119	Malawi	Abbott RealTime	Erba, F.; 2015
Crianças infectadas pelo HIV-1	158	Moçambique	Abbott RealTime	Erba, F.; 2015
Pacientes infectados pelo HIV-1 em uso de ART	200	Quênia	Roche COBAS Ampliprep/COBAS Taqman X Abbott m2000	Zeh, C., 2017
Crianças infectadas pelo HIV-1 em uso de ART	723	Maputo – Moçambique	Abbott RealTime HIV-1	Chang, J.; 2017

Existem, ainda, estratégias distintas que facilitam a coleta do sangue para avaliação da CV. A maioria dos estudos de DBS *versus* plasma é realizada usando DBS a partir de sangue venoso coletado em tubos de EDTA (Parkin, 2014; World Health Organization *et al.*, 2014). O DBS é mais fácil de ser preparado utilizando a punção no dedo (em adultos) ou no calcanhar (em bebês) (Parkin, 2014). Em um estudo realizado em 2017 utilizando a mesma metodologia do presente estudo, foi feito um comparativo entre a coleta no DBS a partir do dedo e do sangue venoso *versus* o padrão de plasma, demonstrando que, independente de como ou da área de coleta do sangue, ambos têm desempenho muito semelhantes (Tang *et al.*, 2017). O uso da coleta no DBS a partir da punção digital para o monitoramento da CV é uma oportunidade que permite uma mudança na avaliação em locais com recursos limitados (Rutstein *et al.*, 2014).

Tais evidências demonstram que o uso do DBS constitui uma ferramenta mais acessível e de armazenagem facilitada, ampliando assim o monitoramento da CV

em programas de rede pública de saúde, principalmente em locais com grandes distâncias geográficas, e ampliando também o acesso ao tratamento antirretroviral nos contextos dos países de baixa e média renda.

2. Justificativa

Os exames de CV plasmática refletem a dinâmica replicativa do vírus, pois estes quantificam as partículas que são produzidas e liberadas na circulação sanguínea do indivíduo infectado pelo HIV. Desta forma, é importante que haja um monitoramento periódico com a utilização de exames de quantificação da CV, que é um marcador que não só fornece os dados quantitativos referentes às partículas virais circulantes, bem como auxilia na avaliação da resposta ao tratamento antirretroviral e a falha terapêutica em pacientes já tratados, quando em combinação com o resultado do exame de genotipagem do HIV (Waters *et al.*, 2007; Garrido *et al.*, 2009), os quais constituem ferramentas importantes para a reestruturação da combinação terapêutica a ser utilizada.

O uso do DBS auxilia no monitoramento da CV em locais de difícil acesso ou onde a metodologia não está disponível. A relação custo-benefício da técnica é considerada positiva, principalmente quando se leva em consideração que não é necessário criar ou adaptar laboratórios para a realização destes testes, contratar pessoal treinado, comprar ou alugar equipamentos ou freezers para armazenagem do material, mas sim arcar com gastos referentes à aquisição do cartão de coleta de amostras, o que possibilita que haja redução nos custos quando se utiliza o DBS

Outras vantagens são: utilizar uma quantidade menor de sangue do paciente e ser mais facilmente transportado, o que simplifica a logística para utilização deste tipo de material. O emprego do DBS é também aplicável no caso de transporte de material para outros países, uma vez que a forma de armazenamento deste material é mais fácil (dentro de caixas com dissecantes), sua forma de envio tem menor custo e acredita-se que tenha um maior tempo de duração do material coletado quando armazenado de forma correta, podendo inclusive ser armazenado em diferentes temperaturas.

O uso do DBS no Brasil vem se expandindo, podendo ser observada a sua utilização não somente para a quantificação da CV do HIV-1, mas também para estudos de detecção e quantificação do vírus da hepatite C (HCV), demonstrando que pode ser uma boa alternativa para diagnóstico de algumas doenças (Flores, *et*

al., 2017). O presente estudo foi realizado com a finalidade de comparar o desempenho da técnica de quantificação da CV do HIV-1 em DBS - que é ainda pouco utilizada no Brasil – com a quantificação da CV do HIV-1 a partir do plasma, com o intuito de auxiliar no diagnóstico, no manejo clínico e no tratamento de pacientes infectados pelo HIV-1.

3. Objetivos

Objetivo geral:

- Avaliar a viabilidade do emprego do DBS para quantificação da CV de pacientes infectados pelo HIV-1 em amostras clínicas, para uso, inicialmente, no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do IOC/FIOCRUZ.

Objetivos específicos:

- Adaptar o método de extração comercial utilizado para detecção do RNA do HIV-1 no plasma em amostras coletadas em DBS;

- Comparar os resultados de CV obtidas a partir do plasma e do DBS, a fim de avaliar a correlação entre eles;

- Determinar a concordância entre os métodos utilizados para quantificação da CV do HIV-1 a partir do plasma e do DBS;

- Otimizar o protocolo da técnica de PCR em tempo real para detecção da CV do HIV-1 em amostras clínicas coletadas no DBS para uso, inicialmente, no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do IOC/FIOCRUZ.

4. Metodologia

4.1 Casuística

No presente estudo, foram incluídas 102 amostras de sangue de indivíduos soropositivos para o HIV-1, que apresentavam falha terapêutica, encaminhadas no âmbito da Rede de Carga Viral e Genotipagem do Programa Nacional de IST/Aids do Ministério da Saúde ao Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-RJ, para a realização da CV pelo método m2000sp Abbott RealTime HIV-1. As amostras foram estratificadas de acordo com a CV plasmática: Faixa A: abaixo de 1000 cópias/ml Faixa B: $1.000 \leq CV < 10.000$ cópias/mL; Faixa C: $10.000 \leq CV < 50.000$ cópias/mL e Faixa D: $CV \geq 50.000$ cópias/mL (Tabela 2). Para estratificação dos resultados das quantificações de CV selecionamos faixas que estão de acordo com os resultados mais frequentes, na tentativa de fazer com que a distribuição das amostras entre as faixas distintas fosse o mais equivalente possível.

TABELA 2 – FAIXAS DE CARGA VIRAL SELECIONADAS PARA O ESTUDO EM CÓPIAS/mL E LOG₁₀

Faixas de Carga Viral	Valores em Cópias/mL	log ₁₀
A	< 1.000	< 3,00
B	$\geq 1.000 < 10.000$	3,00 – 4,00
C	$\geq 10.000 < 50.000$	4,00 – 4,69
D	≥ 50.000	> 4,69

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do IOC/FIOCRUZ, como emenda de um projeto anterior, denominado “Padronização e avaliação clínica da técnica de genotipagem *in house* para detecção de mutações de resistência e de subtipos do HIV-1 a partir de amostras de sangue aplicadas em papel de filtro”, sob o CAAE nº 47949215.0.0000.5248.

4.2 Processamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 5mL contendo EDTA e enviadas ao laboratório para processamento de acordo com os seguintes protocolos de CV:

(1) CV a partir do plasma (convencional): O plasma foi obtido por centrifugação do sangue total a 1500rpm por 10 minutos, e estocado a -70°C até o momento do uso.

(2) CV a partir do DBS: Um volume de $70\mu\text{l}$ ou $100\mu\text{l}$ de sangue total foi aplicado com uma pipeta calibrada em 5 campos do DBS (Whatman N° 903), certificando que cada círculo estava totalmente preenchido, mas não em excesso. O fato de termos dois volumes distintos justifica-se porque no início da seleção dos pacientes seguíamos o protocolo do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para a quantidade de $100\mu\text{l}$ de amostra em cada círculo do cartão, já que não havia ainda sido registrado no mercado o kit de DBS da Abbott. Quando tivemos acesso ao protocolo estabelecido pela Abbott, optamos por seguir estritamente as normas do fabricante, e a partir de então passamos a dispensar no DBS o volume de $70\mu\text{l}$ de sangue.

Após a secagem a temperatura ambiente ($15-30^{\circ}\text{C}$) entre 3 a 18hs, os discos foram acondicionados em sacos plásticos individuais e armazenados a -70°C até a realização do teste (Figura 6).

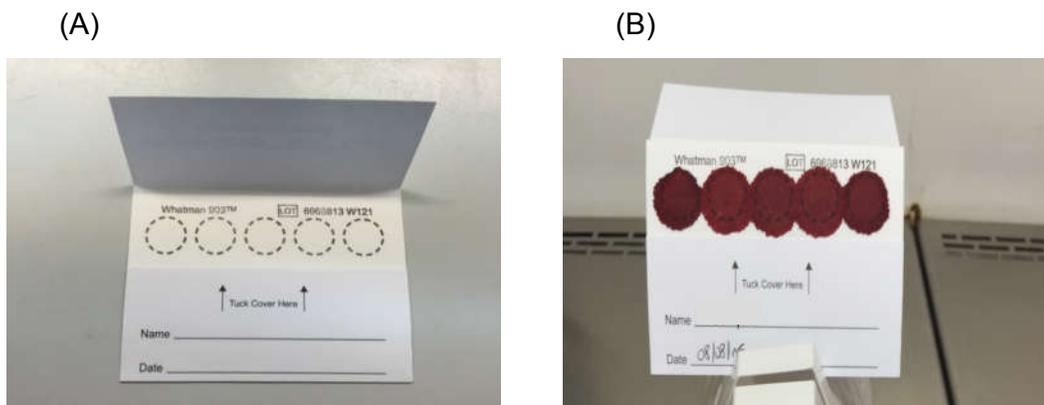


Figura 6. DBS antes (A) e após (B) a dispensação do sangue total.

4.3 Quantificação de Carga Viral

O ensaio Abbott RealTime HIV-1 utiliza a tecnologia de PCR com detecção de fluorescência em tempo real. O desenho da sonda de fita dupla possibilita a detecção de diversos subtipos do grupo M (subtipos A, B, C, D, CRF01-AE, F, CRF02-AG, G, H), N e O, e seus resultados são expressos em cópias/mL ou Unidades internacionais/mL (UI/mL). A sequência alvo para este ensaio é a região da Integrase do gene *POL* do HIV-1, sendo esta uma região extremamente conservada. Além disso, os iniciadores foram desenvolvidos de modo a hibridizar-se com a região mais conservada. Esta técnica utiliza a RT-PCR para gerar produtos amplificados a partir do RNA do HIV-1 em amostras de pacientes infectados. Uma sequência de DNA não relacionada ao HIV-1 (DNA de Abóbora) é amplificada simultaneamente no RT-PCR servindo de controle interno (CI) durante todo o processo. A quantificação do produto amplificado a partir da amostra será proporcional à quantidade de sondas de oligonucleotídeos marcadas por fluorescência referente à sequência alvo do HIV-1 (Abbott Molecular, 2013).

4.4 Extração e amplificação do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir das amostras de plasma pela plataforma m2000sp (Abbott, Estados Unidos), a qual utiliza como princípio a ação de micropartículas magnéticas que concentram (ou que se ligam) ao RNA viral presente na amostra. O RNA viral das amostras no DBS foi extraído a partir de 1 spot do cartão para extração. A quantificação do RNA viral foi realizada utilizando-se o kit

Abbott RealTime HIV-1 e as plataformas m2000sp para extração e a plataforma m2000rt para amplificação (Figura 7).

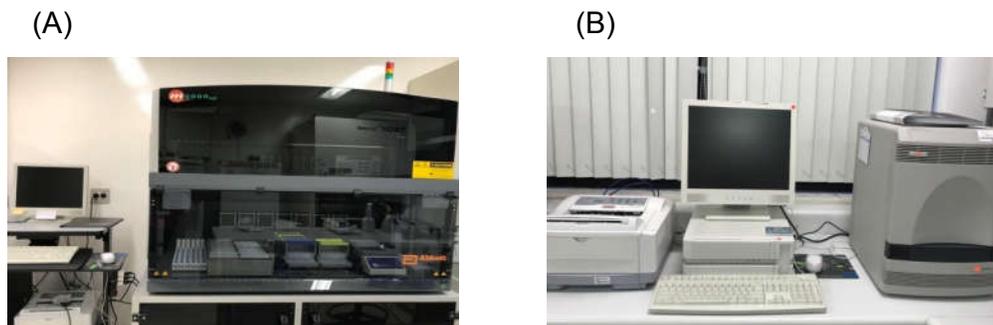


Figura 7: Plataformas de extração (m2000sp) (A) e amplificação (m2000rt) (B) da carga viral.

Para as amostras de DBS, empregou-se uma tesoura que era utilizada por paciente e depois autoclavada, para recortar 1 *spot* do cartão de DBS por paciente, que foi adicionado a um tubo contendo tampão de lise contendo tiocianato de guanidina que é específico para uso em DBS, e foi fornecido pela Abbott. Os tubos contendo o tampão e os *spots* de DBS foram colocados em um bloco de aquecimento a seco a 55 °C por 30 minutos para desprender o RNA viral do cartão. Após o término da incubação, misturou-se gentilmente os tubos, que foram em seguida colocados no equipamento m2000sp. Todo o equipamento foi abastecido de placas, tubos e ponteiras, os quais constituem insumos utilizados no processo automático de extração. Foram dispensados 500ul de CI no tampão de lise e os outros reagentes tais como água, tampão de lavagem, micropartículas magnéticas e eluente foram colocados em suas *racks*, dando-se assim início à extração das amostras, que é um processo totalmente automatizado. Ao final da extração, é colocada uma placa de 96 poços no equipamento m2000sp, e o material eluído resultante da extração do RNA provenientes das amostras é transferido para essa placa, juntamente com um mix fornecido com o kit, contendo os reagentes necessários para a próxima etapa (amplificação). Ao final deste processo, a placa é selada com um selante óptico e transportada para a plataforma m2000rt, onde se dá a etapa de amplificação do RNA viral. Como não existe necessidade de quebra da

sonda na etapa de amplificação, sendo apenas a ligação à sonda para gerar o sinal de fluorescência, utiliza-se uma ciclagem composta por 35 ciclos a 92°C para a etapa de desnaturação do RNA, seguida de 56°C para a etapa de extensão, finalizando com a detecção do sinal de fluorescência a 35°C. Após o término da reação, com o auxílio do programa utilizado no equipamento, os dados são apresentados diretamente no computador que fica acoplado ao equipamento e exportados em arquivo de texto para um CD, onde o resultado é enviado para o sistema de liberação de resultados do Ministério da Saúde e uma cópia é armazenada em um drive de backup.

A faixa de CV detectável por esta metodologia varia entre 40 a 10.000.000 cópias/mL para o plasma e 839 a 10.000.000 cópias/mL para o DBS, sendo considerada uma metodologia sensível e rápida, facilitando a liberação dos resultados (Abbott Molecular, 2016).

4.5 Análises estatísticas

Para a análise exploratória dos dados foram feitos *boxplots* e testes de média (Teste t) e mediana (Teste de Wilcoxon) com o intuito de comparar os resultados obtidos para o grupo de 92 amostras. Para avaliar a correlação entre os valores de CV expressos em \log_{10} obtidos por meio das duas metodologias empregadas (plasma e DBS), foi empregada a regressão linear e estimado o coeficiente de correlação de Pearson. Para avaliar a concordância entre as duas metodologias utilizadas, foi utilizada a análise de Bland-Altman, através da qual as diferenças entre os resultados individuais de CV a partir do plasma e do DBS são apresentadas comparativamente à média dos dois resultados. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R v.3.4.0. O nível de significância considerado nas análises foi de 5%. Essa etapa contou com a colaboração da Dra. Neilane Bertoni, da Coordenação de Pesquisa na Divisão de Epidemiologia no Instituto Nacional do Câncer, INCA.

No presente estudo, considerou-se para todas as análises os valores de CV expressos em \log_{10} . Nas análises comparativas dos resultados das quantificações de CV plasmática e em DBS, estes foram considerados “concordantes” quando a diferença entre os valores de CV foi menor ou igual a $0,5\log_{10}$; enquanto que resultados “discordantes” foram aqueles cuja diferença foi maior do que $0,5 \log_{10}$. Este é o valor utilizado como critério para avaliação clínica dos pacientes com relação a condutas terapêuticas empregadas (Abbott Molecular, 2013).

5. Resultados

O conjunto original de amostras elegíveis para o estudo era composto por 102 amostras. Desse total, 10 amostras (9,8%) foram excluídas antes de qualquer análise, pelos seguintes motivos: indisponibilidade da amostra em DBS (n=2); indisponibilidade do resultado da CV plasmática (n=1); CV indetectável em DBS (n=6) ou erro do equipamento durante a etapa de amplificação (n=1). Portanto, 92 amostras foram avaliadas neste estudo.

As amostras de sangue total foram dispensadas no DBS logo após a chegada ao laboratório e após a secagem de 3 a 18 horas, eram armazenadas em freezer -70°C (com dissecante). Já o plasma era separado após a centrifugação do sangue total, e tinha seu material genético extraído e amplificado no mesmo dia. Uma alíquota de plasma reserva foi armazenada a -70°C para ser utilizada em caso de repetição.

5.1 Padronização da extração das amostras coletadas em DBS

Foi possível quantificar a CV do HIV-1 a partir do RNA viral extraído das 92 amostras incluídas no estudo (vide resultados no item 10.3), portanto, podemos dizer que todas as amostras aplicadas em DBS tiveram o RNA viral extraído com sucesso utilizando os equipamentos m2000sp e m2000rt e seguindo o protocolo de extração de DBS já estabelecido pela Abbott, a qual incluía o uso de um tampão específico para uso em DBS (item 4.4, seção Metodologia), não havendo necessidade de ajuste de volume ou condições de temperatura.

5.2 Comparação dos resultados de CV em DBS com diferentes volumes inicialmente utilizados

Conforme detalhado na seção “Metodologia”, durante a realização do estudo houve uma mudança no volume estabelecido para dispensação da amostra no DBS.

Em virtude desta alteração, tornou-se importante sabermos se a diferença entre os volumes (DBS100 e DBS70) poderia interferir de alguma forma nos resultados obtidos. Assim, inicialmente foi realizada uma comparação dos resultados obtidos para o DBS70 (empregado após o DBS100), a partir de um conjunto de 7 amostras selecionadas a partir de suas cargas virais plasmáticas, de modo a contemplar as faixas distintas adotadas no presente trabalho (Tabela 3).

Para isso, dispensamos o sangue total das 7 amostras da rotina laboratorial da CV que foram selecionadas no papel de filtro e realizamos o protocolo de CV plasmática.

TABELA 3 – RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CV PLASMÁTICA, EM DBS 70 E EM DBS 100 DAS 7 AMOSTRAS EMPREGADAS NA COMPARAÇÃO DO ENSAIO

Amostra	CV plasmática		CV DBS 70		CV DBS 100	
	cp/mL	log ₁₀	cp/mL	log ₁₀	cp/mL	log ₁₀
1	449.826	5,65	1.068.539	6,03	1.577.483	6,20
2	40.404	4,61	93.349	4,97	105.608	5,02
3	2.201	3,34	5.785	3,76	7.179	3,86
4	9.330	3,97	22.233	4,35	22.404	4,35
5	20.225	4,31	34.101	4,53	35.428	4,55
6	50.269	4,70	103.216	5,01	90.311	4,96
7	32.476	4,51	79.069	4,90	59.101	4,77

As análises estatísticas desses resultados mostraram que as medianas das CV obtidas utilizando-se DBS70 e DBS100 não são estatisticamente distintas ($p=0.6875$), o que nos permitiu concluir que essa variação no volume dispensado no DBS não tem interferência significativa sobre o resultado da quantificação da CV.

5.3 Distribuição dos resultados das quantificações de CV plasmática versus em DBS

Com base nos resultados apresentados no item 5.2, decidimos avaliar as 92 amostras incluídas no estudo como um único conjunto de amostras, independentemente de o volume inicial dispensado no papel de filtro ter sido 70 ou

100 ul. A análise exploratória dos resultados das quantificações de CV plasmática e em DBS mostrou que as medianas dos valores obtidos são bastante similares ($\approx 4 \log_{10}$) (Figura 8). Além disso, observa-se que houve uma maior variação dos valores de CV no plasma quando comparados aos valores em DBS.

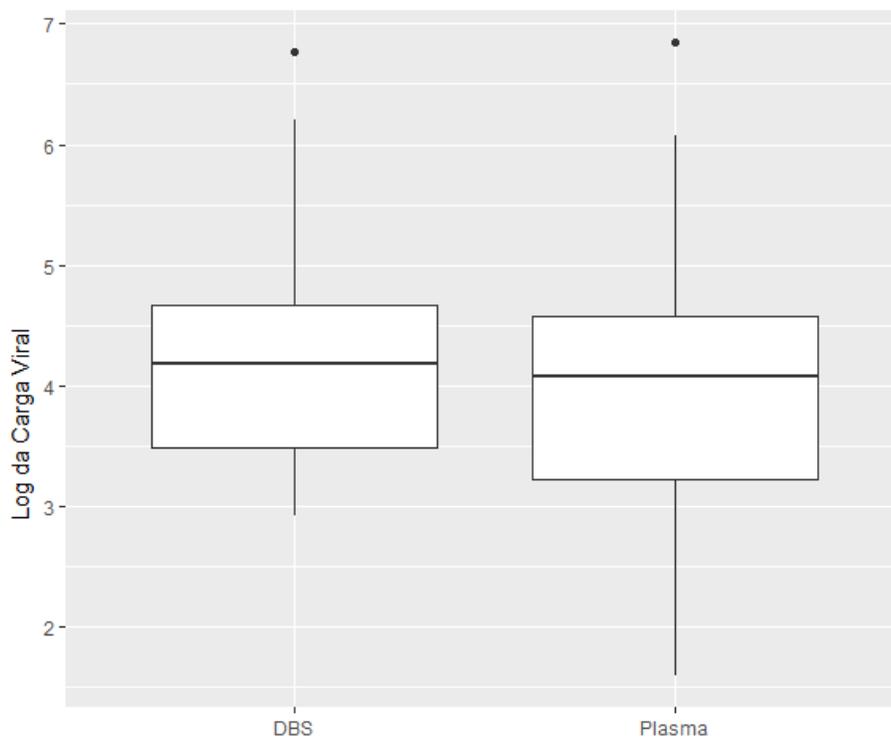


Figura 8. Distribuição das cargas virais (\log_{10}) entre DBS e plasma agrupando as 92 amostras do estudo. Linhas dos boxplots = quartis; Linha no interior do boxplot = mediana; Barras verticais = intervalos entre valores extremos (mínimo e máximo); Círculos = observações fora do intervalo (outliers)

No presente estudo, as 92 amostras foram categorizadas em 4 grupos de acordo com faixas de diferentes valores de CV plasmática (item 1, seção Metodologia). A Tabela 4 mostra a distribuição das amostras nas diferentes faixas. A faixa C foi a que concentrou maior quantidade de amostras tanto no plasma quanto no DBS ($n=29$; 32%), seguida das faixas B, D e A. É importante destacar que na faixa A estão incluídas 15 amostras cujas CV plasmáticas e/ou em DBS estavam abaixo do limite mínimo de detecção do teste ($=40$ cópias/ml para CV plasmática e $=839$ cópias/ml para DBS), sendo: 12 amostras com CV abaixo do limite mínimo no DBS e

valores mensuráveis para o plasma; 2 amostras com CV plasmática abaixo do limite mínimo e com valores detectáveis no DBS e 1 amostra com CV abaixo do limite mínimo de detecção para ambos os métodos. Para estas amostras, foram atribuídos os valores de 39 cp/mL para o plasma e 838 cp/mL para o DBS.

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM AS FAIXAS DE CARGA VIRAL PLASMÁTICA E EM DBS UTILIZADAS NO ESTUDO

Faixas de Carga Viral	Valores em Cópias/mL	Plasma		DBS	
		N.	%	N.	%
A	< 1.000	17	18%	15	16%
B	≥ 1.000 < 10.000	28	30%	26	28%
C	≥ 10.000 < 50.000	29	32%	29	32%
D	≥ 50.000	18	20%	22	24%
Total		92	100%	92	100%

Avaliando a classificação das amostras nas diferentes faixas considerando-se o plasma e o DBS, podemos observar que a maioria das amostras (N=74; 80%) teve a mesma classificação quando considerada a CV plasmática ou em DBS (Tabela 4). Dentre as 18 amostras não concordantes, 4 (22%) estavam dentro dos limites aceitáveis de variação ($0,5 \log_{10}$). A fim de realizarmos uma análise comparativa mais precisa, consideramos também os valores individuais de CV plasmática ou em DBS de cada amostra incluída no estudo. Esta análise mostrou que 78 amostras (85%) apresentaram resultados concordantes, enquanto que 14 amostras (15%) apresentaram resultados discordantes. A Tabela 5 mostra os resultados de CV obtidos para todas as amostras incluídas no estudo. Os resultados de CV das amostras discordantes são apresentados na Tabela 6.

**TABELA 5 – RESULTADOS DE CV PLASMÁTICA E DBS EM CÓPIAS E log DE
TODAS AS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO**

(continua)

ID PROJETO	ul sangue total	CV plasmática (cp/mL)	Log ₁₀	CV DBS (cp/mL)	Log ₁₀	≠ entre Log ₁₀
1	100 ul	37.910	4,58	65.713	4,82	0,24
2	100 ul	8.420	3,93	3.405	3,53	-0,39
3	100 ul	461.201	5,66	296.426	5,47	-0,19
4	100 ul	4.917	3,69	5.282	3,72	0,03
5	100 ul	370	2,57	838	2,92	0,36
6	100 ul	84.081	4,92	73.060	4,86	-0,06
7	100 ul	205	2,31	838	2,92	0,61
9	100 ul	4.198	3,62	4.751	3,68	0,05
10	100 ul	18.297	4,26	14.568	4,16	-0,10
12	100 ul	370.914	5,57	300.948	5,48	-0,09
13	100 ul	1.115	3,05	838	2,92	-0,12
14	100 ul	91	1,96	1.207	3,08	1,12
15	100 ul	135.416	5,13	146.607	5,17	0,03
16	100 ul	177.804	5,25	183.987	5,26	0,01
17	100 ul	1.464	3,17	3.354	3,53	0,36
18	100 ul	1.180.118	6,07	1.579.465	6,20	0,13
19	100 ul	40	1,60	838	2,92	1,32
20	100 ul	7.602	3,88	7.483	3,87	-0,01
21	100 ul	26.069	4,42	10.520	4,02	-0,39
22	100 ul	18.742	4,27	15.016	4,18	-0,10
23	100 ul	40.143	4,60	45.692	4,66	0,06
24	100 ul	17.732	4,25	119.505	5,08	0,83
25	100 ul	99.437	5,00	124.115	5,09	0,10
26	100 ul	43.120	4,63	50.801	4,71	0,07
27	100 ul	15.967	4,20	15.595	4,19	-0,01
28	100 ul	887	2,95	838	2,92	-0,02
30	100 ul	1.638	3,21	4.273	3,63	0,42
31	100 ul	7.845	3,89	23.293	4,37	0,47
32	100 ul	12.803	4,11	21.595	4,33	0,23
33	100 ul	41.658	4,62	40.787	4,61	-0,01
34	100 ul	4.486	3,65	3.279	3,52	-0,14
35	100 ul	4.303	3,63	3.645	3,56	-0,07
36	100 ul	54.520	4,74	75.879	4,88	0,14
37	100 ul	311	2,49	838	2,92	0,43
38	100 ul	23.335	4,37	47.815	4,68	0,31
39	100 ul	1.708	3,23	22.943	4,36	1,13
40	100 ul	3.881	3,59	3.873	3,59	0,00

(continua)

ID PROJETO	ul sangue total	CV plasmática (cp/mL)	Log ₁₀	CV DBS (cp/mL)	Log ₁₀	≠ entre Log ₁₀
1	100 ul	37.910	4,58	65.713	4,82	0,24
2	100 ul	8.420	3,93	3.405	3,53	-0,39
3	100 ul	461.201	5,66	296.426	5,47	-0,19
4	100 ul	4.917	3,69	5.282	3,72	0,03
5	100 ul	370	2,57	838	2,92	0,36
6	100 ul	84.081	4,92	73.060	4,86	-0,06
7	100 ul	205	2,31	838	2,92	0,61
9	100 ul	4.198	3,62	4.751	3,68	0,05
10	100 ul	18.297	4,26	14.568	4,16	-0,10
12	100 ul	370.914	5,57	300.948	5,48	-0,09
13	100 ul	1.115	3,05	838	2,92	-0,12
14	100 ul	91	1,96	1.207	3,08	1,12
15	100 ul	135.416	5,13	146.607	5,17	0,03
16	100 ul	177.804	5,25	183.987	5,26	0,01
17	100 ul	1.464	3,17	3.354	3,53	0,36
18	100 ul	1.180.118	6,07	1.579.465	6,20	0,13
19	100 ul	40	1,60	838	2,92	1,32
20	100 ul	7.602	3,88	7.483	3,87	-0,01
21	100 ul	26.069	4,42	10.520	4,02	-0,39
22	100 ul	18.742	4,27	15.016	4,18	-0,10
23	100 ul	40.143	4,60	45.692	4,66	0,06
24	100 ul	17.732	4,25	119.505	5,08	0,83
25	100 ul	99.437	5,00	124.115	5,09	0,10
26	100 ul	43.120	4,63	50.801	4,71	0,07
27	100 ul	15.967	4,20	15.595	4,19	-0,01
28	100 ul	887	2,95	838	2,92	-0,02
30	100 ul	1.638	3,21	4.273	3,63	0,42
31	100 ul	7.845	3,89	23.293	4,37	0,47
32	100 ul	12.803	4,11	21.595	4,33	0,23
33	100 ul	41.658	4,62	40.787	4,61	-0,01
34	100 ul	4.486	3,65	3.279	3,52	-0,14
35	100 ul	4.303	3,63	3.645	3,56	-0,07
36	100 ul	54.520	4,74	75.879	4,88	0,14
37	100 ul	311	2,49	838	2,92	0,43
38	100 ul	23.335	4,37	47.815	4,68	0,31
39	100 ul	1.708	3,23	22.943	4,36	1,13
40	100 ul	3.881	3,59	3.873	3,59	0,00

(conclusão)						
ID PROJETO	ul sangue total	CV plasmática (cp/mL)	Log ₁₀	CV DBS (cp/mL)	Log ₁₀	≠ entre Log ₁₀
85	70 ul	1.925	3,28	3.133	3,50	0,21
86	70 ul	26.474	4,42	38.390	4,58	0,16
87	70 ul	28.406	4,45	37.528	4,57	0,12
88	70 ul	152	2,18	838	2,92	0,74
90	70 ul	6.989	3,84	8.257	3,92	0,07
91	70 ul	37.391	4,57	40.787	4,61	0,04
92	70 ul	58	1,76	838	2,92	1,16
93	70 ul	34.877	4,54	27.101	4,43	-0,11
95	70 ul	39	1,59	1.086	3,04	1,44
96	100 ul	7.791	3,89	15.016	4,18	0,28
97	100 ul	39	1,59	898	2,95	1,36
98	100 ul	49.777	4,70	57.778	4,76	0,06
99	100 ul	23.201	4,37	29.232	4,47	0,10
100	100 ul	7.048	3,85	18.987	4,28	0,43

TABELA 6 – RESULTADOS DE CV PLASMÁTICA E EM DBS (log₁₀) DAS AMOSTRAS CUJOS VALORES FORAM DISCORDANTES

ID PROJETO	ul sangue total	CV plasmática (cp/mL)	Log ₁₀	CV DBS (cp/mL)	Log ₁₀	≠ entre Log ₁₀
7	100 ul	205	2,31	838	2,92	0,61
14	100 ul	91	1,96	1.207	3,08	1,12
19	100 ul	40	1,60	838	2,92	1,32
24	100 ul	17.732	4,25	119.505	5,08	0,83
39	100 ul	1.708	3,23	22.943	4,36	1,13
42	100 ul	39	1,59	838	2,92	1,33
47	100 ul	183	2,26	838	2,92	0,66
53	100 ul	154.759	5,19	45.347	4,66	-0,53
56	100 ul	50	1,70	5.486	3,74	2,04
57	100 ul	297	2,47	1.622	3,21	0,74
88	70 ul	152	2,18	838	2,92	0,74
92	70 ul	58	1,76	838	2,92	1,16
95	70 ul	39	1,59	1.086	3,04	1,44
97	100 ul	39	1,59	898	2,95	1,36

5.4 Análises de correlação e de concordância entre as quantificações de CV plasmática *versus* em DBS

Considerando-se as amostras com CV detectável nos dois métodos (n=77; 84%), a correlação entre os valores de CV obtidos entre as amostras de plasma e DBS foi elevada (coeficiente de correlação de Pearson 0.924 e $R^2 = 0.92$) (Figura 9).

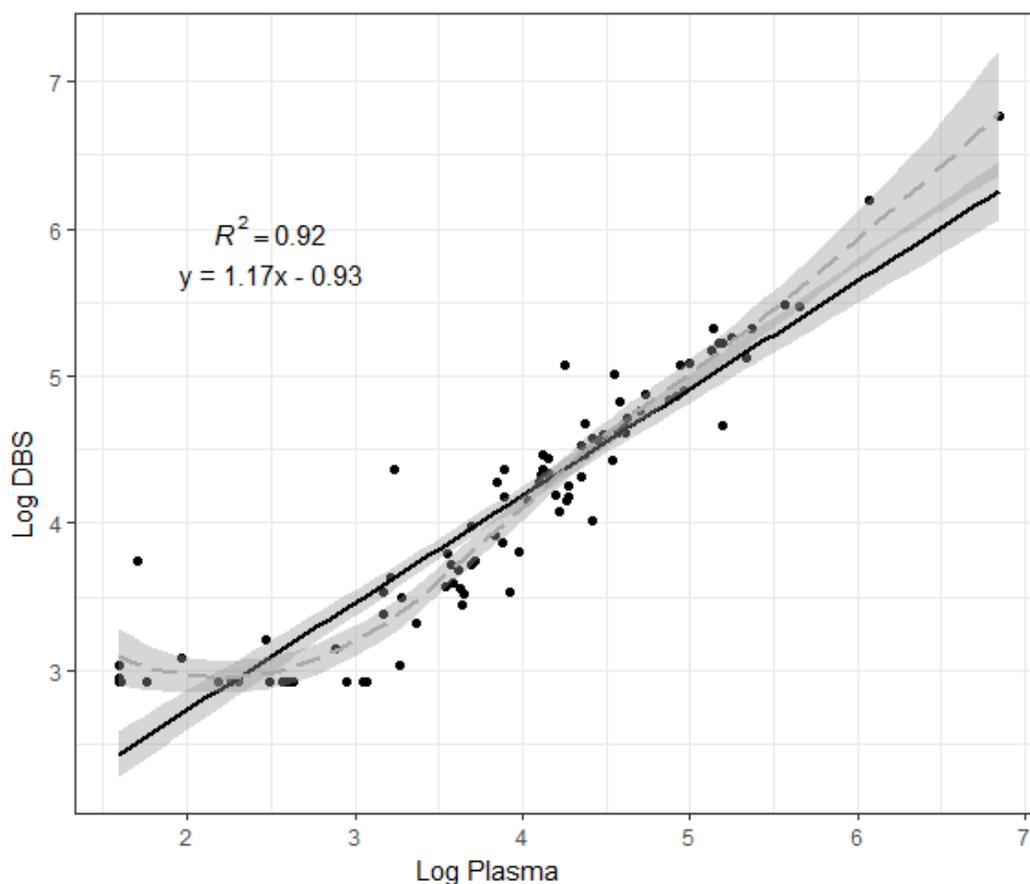


Figura 9. Gráfico de correlação entre os resultados das quantificações de CV a partir do plasma e do DBS.

A análise de concordância entre os métodos mostrou que os resultados se apresentaram bem distribuídos sobre a média de CV obtida (3,87 \log_{10}) e que a grande maioria das amostras (N=84; 91%) apresentou resultados dentro do intervalo de média \pm 1.96 desvio-padrão (DP), com exceção de 8 amostras (9%), sendo

estas as amostras ID: 14, 19, 39, 42, 56, 92, 95 e 97 que ficaram fora deste intervalo (Figura10). A diferença média entre a CV plasmática e em DBS foi de $-0.22 \log_{10}$. Em conjunto, esses resultados nos permitem concluir que houve uma boa concordância entre os dois métodos avaliados.

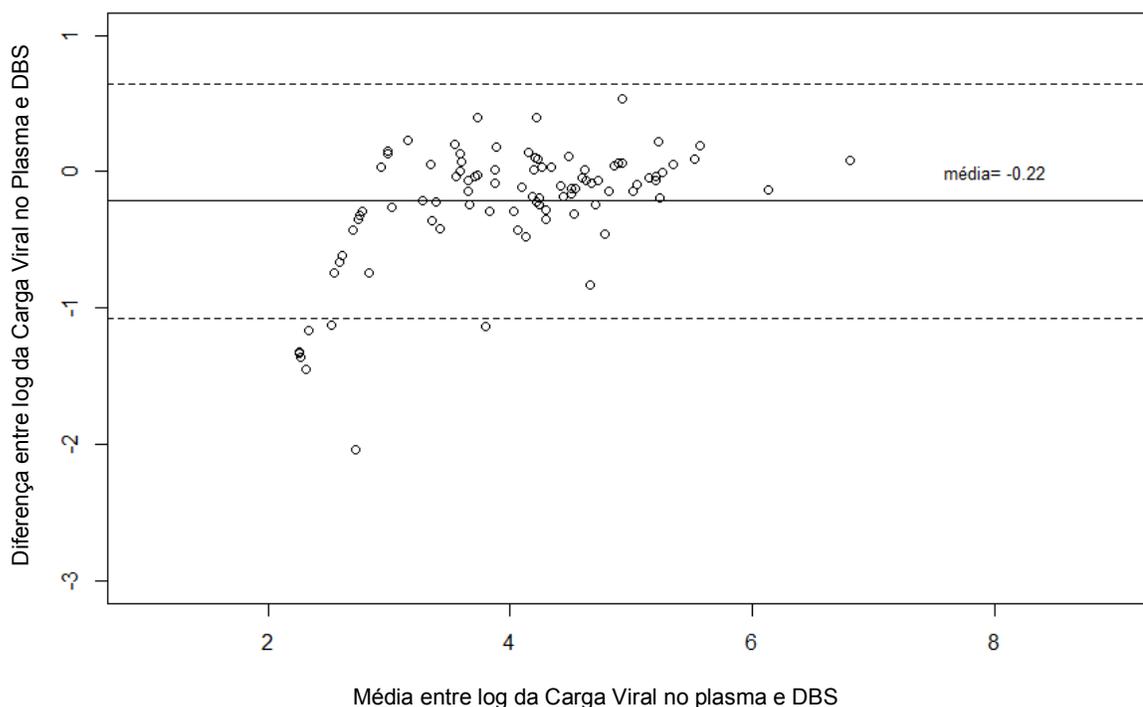


Figura 10. Análise de concordância entre os métodos de quantificação de CV do HIV-1 utilizando plasma e DBS. A linha contínua representa a diferença média entre a CV plasmática e em DBS ($-0.22 \log_{10}$), enquanto que as linhas pontilhadas representam os valores mínimo e máximo do intervalo de média $\pm 1,96$ desvio-padrão (DP)

6. Discussão

A cada dia que passa, as PVHA têm mais possibilidade de ter mais qualidade de vida caso tenham acesso ao uso da terapia antirretroviral e a exames para a quantificação da CV do HIV-1, que é indicada pela OMS como a principal ferramenta de monitoramento da infecção. Um dos desafios enfrentados na luta contra o HIV é que pessoas que vivem em áreas remotas tenham acessos a esses testes com intuito de monitorar o tratamento, pois a ausência de monitoramento pode prejudicar o diagnóstico e o tratamento do paciente (Abbott, 2018).

Os resultados do presente estudo mostram uma boa correlação entre os valores ($R=0,92$) e uma boa concordância entre os métodos (diferença média = $-0.22 \log_{10}$) de quantificação da CV plasmática e em DBS, corroborando com outros estudos que serviram como inspiração neste trabalho (Johannessen *et al.*, 2009; Leelawiwat *et al.*, 2009; Marconi *et al.*, 2009). Em nosso estudo, obtivemos resultados satisfatórios com amostras cuja CV é mais baixa, por exemplo, uma amostra com CV plasmática = $2,60 \log_{10}$ cópias/mL e CV em DBS = $2,92 \log_{10}$ cópias/mL, demonstrando que o DBS pode amplificar com precisão, níveis baixos de carga viral, ao menos quando utilizado o protocolo da Abbott. Isso indica que o DBS pode ser usado como uma alternativa às amostras de plasma no intuito de avaliar os níveis de RNA do HIV-1.

Em diferentes partes do mundo há vários estudos que encontraram boa correlação entre as CV de HIV-1 detectadas a partir de DBS e de amostras de plasma (Ziemniak *et al.*, 2006; Andreotti *et al.*, 2010; Van Schooneveld *et al.*, 2010). Estudos realizados na Ásia, Europa e África, relatam uma correlação significativa entre as CV do HIV-1 plasmática e em DBS com um valor de R^2 variando de 0,75 a 0,88 (Johannessen *et al.*, 2009; Leelawiwat *et al.*, 2009; Marconi *et al.*, 2009), chegando a 0,98 em um estudo realizado em 2012 por David e colaboradores (David *et al.*, 2012). Em nosso estudo, encontramos uma correlação de $R^2 = 0.92$. No estudo de Erba e colaboradores, os resultados de CV obtidos a partir do DBS foram comparáveis com os obtidos a partir do plasma, apresentando uma correlação de $R^2=0,89$ e os métodos apresentaram uma boa concordância, também avaliada pela análise de Bland-Altman (Erba *et al.*, 2015).

Tendo em vista o alto custo para se instalar uma estrutura laboratorial para a realização dos testes de CV em locais com poucos recursos econômicos, a redução no custo dos testes de CV utilizando amostras em DBS em comparação com o teste de CV plasmática pode representar uma diferença significativa quando aplicada em âmbito nacional. Um estudo realizado na Índia apontou que a substituição do teste de carga viral plasmática pelo teste com DBS, num universo de aproximadamente 400.000 indivíduos, corresponde a uma redução média econômica de mais de US\$ 1.000.000 para o sistema público de saúde anualmente (Neogi *et al.*, 2012)

Alguns trabalhos demonstram que a quantificação de CV do HIV-1 é viável em DBS (Monleau *et al.*, 2010; Fajardo *et al.*, 2014; Parkin, 2014; Rutstein *et al.*, 2015), como citado anteriormente. Entretanto, alguns estudos observaram a interferência do DNA proviral no procedimento de quantificação, causando resultados falso-positivos (Parkin, 2014; Rutstein *et al.*, 2015; Boillot *et al.*, 2016; Inzaule *et al.*, 2016). O impacto do DNA proviral é maior quando a CV plasmática é baixa (Guichet *et al.*, 2018). Recentemente foi descrito que a contaminação em amostras de DBS pelo DNA proviral quando utilizado o PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) pode atingir 800-1200 cópias/ 10⁶ (Zida *et al.*, 2016). Tal aspecto não foi avaliado em nosso estudo, tendo em vista que com a intenção de reduzir o impacto do DNA proviral, a Abbott utiliza um método de extração de ácido nucléico com maior especificidade para RNA (Parkin, 2014). De acordo com a Abbott, no intuito de garantir maior confiabilidade nas extrações, são utilizadas partículas magnéticas com desenhos diferentes para os kits de DNA (partículas de sílica) e RNA (partículas de ferro) garantindo a extração específica dos ácidos nucléicos de interesse, não havendo, portanto, contaminação do material genético (Abbott Molecular, 2013).

O DBS representa uma alternativa para o uso da utilização do plasma que facilita a coleta e a logística de transporte das amostras e não requer obrigatoriamente o uso de refrigeração, auxiliando não só no monitoramento clínico dos pacientes, mas também no diagnóstico do HIV-1 e de outras doenças (Lofgren *et al.*, 2009). Um grupo no Sul do Brasil realizou 457 testes com intuito de detectar anticorpos contra o HIV-1 e HIV-2 e relatou excelente desempenho nas análises que utilizaram o DBS, observando que a técnica é uma nova perspectiva para o diagnóstico da infecção

pelo HIV (Castro *et al.*, 2008). No entanto, o uso do DBS não está restrito ao monitoramento e diagnóstico do HIV-1, mas também se aplica a outras doenças, como as hepatites virais. Um estudo realizado na Etiópia comparando a mensuração da CV do vírus da hepatite B (HBV) entre plasma (considerada padrão-ouro) e DBS constatou que o DBS pode ser uma alternativa viável e confiável para quantificação de HBV em locais com recursos limitados (Stene-Johansen *et al.*, 2016). Há também um outro estudo relacionado à hepatite B que avaliou o desempenho de um imunoenensaio comercial otimizado para identificação de HBsAg e anti-HBc em saliva e DBS de acordo com o *status* de pacientes infectados pelo HIV-1. Este estudo contou com 535 indivíduos agrupados como HIV-1 +, HBV +, HIV-1 / HBV + e HIV-1 / HBV- e os resultados demonstraram alta sensibilidade em amostras de DBS (Flores, *et al.*, 2017).

O uso do DBS proporciona diversas vantagens que auxiliam na praticidade da coleta do material, podendo ser feita em tubos de sangue e dispensados nos *spots* do cartão com o auxílio de uma pipeta calibrada, como foi utilizado no presente estudo. Há também a possibilidade de utilizar a punção da ponta do dedo, onde uma agulha perfura o dedo do paciente e com uma pipeta (para garantir o volume correto) o sangue é dispensado diretamente no *spot* do cartão. Outra vantagem seria a temperatura de estocagem do material. Nota-se que, quando avaliadas as temperaturas de estocagem dos cartões o DBS, a amostra permanece estável durante um período de 80 dias em temperatura ambiente (Lofgren *et al.*, 2009), não apresentando perdas significantes de material (Monleau *et al.*, 2010).

Condições de testagem de rotina foram avaliadas em um recente estudo, no qual as amostras coletadas em DBS foram mantidas a temperatura ambiente por duas semanas, a fim de se reproduzir o atraso entre a coleta do sangue em DBS e a mensuração da CV, com resultados satisfatórios que embasam o uso do DBS para monitoramento da CV no Vietnã (Taieb *et al.*, 2016).

Uma limitação deste trabalho foi que os espécimes DBS foram armazenados somente a -70°C , pelo fato de termos seguido às orientações do CDC. No entanto, há estudos indicando que as amostras se mantêm estáveis em temperatura ambiente. Essa comparação entre as diferentes condições de estocagem teria sido

importante, dado o contexto de uso do DBS em diferentes localidades. De acordo com a Abbott, os cartões podem ficar acondicionados entre 15 – 30°C por até 8 semanas em condições com umidade relativa inferior a 85% (Abbott Molecular, 2016). Já em condições com alta umidade (acima de 85%), os cartões podem ser armazenados em temperatura ambiente por até 2 semanas. Segundo a empresa, há também um modo alternativo de estocagem dos cartões entre 2 a 8°C ou abaixo de -10°C por até 12 semanas (Abbott Molecular, 2016)

O DBS pode ser usado como uma alternativa para monitorar pacientes em uso de antirretrovirais (Guichet *et al.*, 2018). Desta forma, o nosso estudo demonstrou que a quantificação da CV do HIV-1 em DBS usando um ensaio comercial padronizado fornece resultados confiáveis, o que pode impactar na melhoria do monitoramento do HIV-1, ampliando o acesso à realização da quantificação da CV em áreas remotas e auxiliando no atendimento das necessidades da população em termos de saúde pública. Os resultados obtidos no presente estudo apontam para a viabilidade da utilização do DBS para monitoramento da CV do HIV-1 de modo satisfatório, o que representa um avanço em termos logísticos e econômicos, além de constituir uma estratégia que possa contribuir para a qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV-1 em nosso país.

7. Conclusões

- O método utilizado para a extração das amostras aplicadas em DBS foi empregado com êxito, tendo em vista que foi possível quantificar a CV do HIV-1 a partir do RNA viral extraído de todas as 92 amostras incluídas no estudo, não sendo necessários ajustes no protocolo de extração de DBS.
- Quando consideradas as faixas de CV utilizadas no estudo (A-D), observamos uma concordância de 80% entre as amostras quando comparados os resultados de CV obtidos em plasma e em DBS. No entanto, quando considerados os resultados de forma individual, observamos uma concordância de 85%, respeitando a diferença de $0,5\log_{10}$ utilizada como critério para avaliação clínica dos pacientes.
- Houve uma boa correlação entre os valores de CV no plasma e no DBS (coeficiente de correlação de Pearson 0.924 e $R^2 = 0.92$). Além disso, observou-se uma boa concordância entre os métodos (diferença média = $-0.22 \log_{10}$).
- Foi gerado um POP da técnica de PCR em tempo real para detecção da CV do HIV-1 em amostras coletadas no DBS para uso inicialmente no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do IOC/FIOCRUZ, com intuito de otimizar a técnica de CV. Tal protocolo constitui um Procedimento Operacional Padrão (POP) e tem grandes possibilidades de ter seu uso estendido para outros laboratórios ou serviços que vislumbrem a necessidade de empregar essa técnica a partir do DBS (ANEXO A).

8. Perspectivas

Caso seja possível futuramente adquirir kits para quantificação da CV do HIV-1, temos interesse em testar amostras de sangue em DBS que sejam armazenadas sob temperatura ambiente, a fim de confirmar a viabilidade dos cartões armazenados sob diferentes temperaturas, como já observado em alguns trabalhos.

Publicar os resultados aqui apresentados em revista científica indexada, a fim de divulgar os dados gerados para a comunidade científica, além de auxiliar outros locais ou grupos de pesquisa que tenham interesse em utilizar o protocolo de extração da Abbott utilizando o DBS. A publicação dos resultados poderia contribuir também para que se avalie, em conjunto com outros resultados obtidos em estudos Brasileiros, a possibilidade de adoção do DBS nas práticas regulamentadas pelo Ministério da Saúde - ao menos com relação à quantificação da CV do HIV-1-, o que teria implicações importantes em termos de saúde pública.

9. Referências

ABBOTT. Dried Blood Spot: acesso mais fácil para os testes de carga viral do HIV. 2018.

ABBOTT MOLECULAR. **Manual de procedimentos operacionais**. Brasil: 1-77 p. 2013.

_____. **Extended DBS Sample Claim - RealTime HIV-1**

Viral Load using Dried Blood Spots (DBS) 2016.

ALCAMÍ, J.; COIRAS, M. [Immunopathogenesis of HIV infection]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 29, n. 3, p. 216-26, Mar 2011. ISSN 1578-1852.

ALVAREZ-MUNOZ, M. T. et al. High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions. **Arch Med Res**, v. 36, n. 4, p. 382-6, Jul-Aug 2005. ISSN 0188-4409 (Print)0188-4409.

AN, P.; WINKLER, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet**, v. 26, n. 3, p. 119-31, Mar 2010. ISSN 0168-9525 (Print).

ANDREOTTI, M. et al. Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. **J Clin Virol**, v. 47, n. 1, p. 4-7, Jan 2010. ISSN 1386-6532.

BALINDA, S. N. et al. Clinical Evaluation of an Affordable Qualitative Viral Failure Assay for HIV Using Dried Blood Spots in Uganda. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0145110, 2016. ISSN 1932-6203.

BARBOUR, J. D.; GRANT, R. M. The role of viral fitness in HIV pathogenesis. **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 2, n. 1, p. 29-34, Feb 2005. ISSN 1548-3568 (Print)1548-3568.

BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 20 1983. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

BENEDICTO, P. et al. Assessment of the accuracy of dried blood spot (DBS) sample in HIV-1 viral load as compared to plasma sample using Abbot assay -. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 338-342, 2017.

BERTAGNOLIO, S. et al. Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. **AIDS Rev**, v. 12, n. 4, p. 195-208, Oct-Dec 2010. ISSN 1139-6121.

BLUMENTHAL, R.; DURELL, S.; VIARD, M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. **J Biol Chem**, v. 287, n. 49, p. 40841-9, Nov 30 2012. ISSN 0021-9258.

BOILLOT, F. et al. Implementation and Operational Research: Programmatic Feasibility of Dried Blood Spots for the Virological Follow-up of Patients on Antiretroviral Treatment in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 71, n. 1, p. e9-15, Jan 1 2016. ISSN 1525-4135.

BRAMBILLA, D. et al. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1888-93, May 2003. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137.

BRENCHLEY, J. M.; PRICE, D. A.; DOUEK, D. C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? **Nat Immunol**, v. 7, n. 3, p. 235-9, Mar 2006. ISSN 1529-2908 (Print)1529-2908.

CASSOL, S. et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from dried plasma spots collected on filter paper. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 11, p. 2795-801, Nov 1997. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137.

CASTRO, A. C. et al. Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 3, p. 151-6, May-Jun 2008. ISSN 0036-4665 (Print)0036-4665.

CHERRINGTON, J.; GANEM, D. Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. **Embo j**, v. 11, n. 4, p. 1513-24, Apr 1992. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189.

CHOOPANYA, K. et al. Antiretroviral prophylaxis for HIV infection in injecting drug users in Bangkok, Thailand (the Bangkok Tenofovir Study): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. **Lancet**, v. 381, n. 9883, p. 2083-90, Jun 15 2013. ISSN 0140-6736.

CLAPHAM, P. R.; WEISS, R. A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**, v. 388, n. 6639, p. 230-1, Jul 17 1997. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836.

COFFIN, J. et al. Human immunodeficiency viruses. **Science**, v. 232, n. 4751, p. 697, May 09 1986. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

COHEN, M. S. et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. **N Engl J Med**, v. 365, n. 6, p. 493-505, Aug 11 2011. ISSN 0028-4793.

COHEN, O. J.; KINTER, A.; FAUCI, A. S. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. **Immunol Rev**, v. 159, p. 31-48, Oct 1997. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896. COHEN, O. J.; WEISMAN, D. F., A.S. **Fundamental Immunology (4th edn) edited by W.E. Paul - ScienceDirect**. 4. Philadelphia: 1999.

DAVID, S. et al. Comparison of HIV-1 RNA level estimated with plasma and DBS samples: a pilot study from India (South). **Indian J Med Microbiol**, v. 30, n. 4, p. 403-6, Oct-Dec 2012. ISSN 0255-0857.

DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15035, Oct 1 2015. ISSN 2056-676x.

DING, Y. et al. Timing of antiretroviral therapy initiation after diagnosis of recent human immunodeficiency virus infection and CD4(+) T-cell recovery. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, n. 3, p. 290.e5-8, Mar 2016. ISSN 1198-743x.

ERBA, F. et al. Measurement of viral load by the automated Abbott real-time HIV-1 assay using dried blood spots collected and processed in Malawi and Mozambique. **S Afr Med J**, v. 105, n. 12, p. 1036-8, Nov 08 2015. ISSN 0256-9574 (Print).

FAJARDO, E. et al. Prospective evaluation of diagnostic accuracy of dried blood spots from finger prick samples for determination of HIV-1 load with the NucliSENS Easy-Q HIV-1 version 2.0 assay in Malawi. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1343-51, May 2014. ISSN 0095-1137.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Acute toxoplasmosis: study of the frequency, vertical transmission rate and the relationship between maternal-fetal diagnostic tests during pregnancy in a Central-Western state of Brazil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 8, p. 442-449, 08/2005 2005. ISSN 0100-7203.

FLORES, G. L. et al. Performance of ANTI-HCV testing in dried blood spots and saliva according to HIV status. **J Med Virol**, v. 89, n. 8, p. 1435-1441, Aug 2017. ISSN 0146-6615.

_____. Evaluation of HBsAg and anti-HBc assays in saliva and dried blood spot samples according HIV status. **J Virol Methods**, v. 247, p. 32-37, Sep 2017. ISSN 0166-0934.

FREED, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, v. 251, n. 1, p. 1-15, Nov 10 1998. ISSN 0042-6822 (Print)0042-6822.

_____. HIV-1 replication. **Somat Cell Mol Genet**, v. 26, n. 1-6, p. 13-33, Nov 2001. ISSN 0740-7750 (Print)0740-7750.

FREED, E. O.; MARTIN, M. A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. **J Biol Chem**, v. 270, n. 41, p. 23883-6, Oct 13 1995. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258.

GALLO, R. C. Kaplan memorial lecture. The family of human lymphotropic retroviruses called HTLV: HTLV-I in adult T-cell leukemia (ATL), HTLV-II in hairy cell leukemias, and HTLV-III in AIDS. **Princess Takamatsu Symp**, v. 15, p. 13-38, 1984.

GARRIDO, C. et al. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 1031-6, Apr 2009. ISSN 0095-1137.

GOTO, T. et al. Projection structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) observed with high resolution electron cryo-microscopy. **J Electron Microsc (Tokyo)**, v. 43, n. 1, p. 16-9, Feb 1994. ISSN 0022-0744 (Print)0022-0744.

GOTO, T.; NAKAI, M.; IKUTA, K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p. 123-38, Apr-Jun 1998. ISSN 0968-4328 (Print)0968-4328.

GOTTE, M.; LI, X.; WAINBERG, M. A. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. **Arch Biochem Biophys**, v. 365, n. 2, p. 199-210, May 15 1999. ISSN 0003-9861 (Print)0003-9861.

GOTTLINGER, H. G.; SODROSKI, J. G.; HASELTINE, W. A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 15, p. 5781-5, Aug 1989. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.

GUICHET, E. et al. Comparison of different nucleic acid preparation methods to improve specific HIV-1 RNA isolation for viral load testing on dried blood spots. **J Virol Methods**, v. 251, p. 75-79, Jan 2018. ISSN 0166-0934.

HAMERS, R. L. et al. Dried fluid spots for HIV type-1 viral load and resistance genotyping: a systematic review. **Antivir Ther**, v. 14, n. 5, p. 619-29, 2009. ISSN 1359-6535 (Print)1359-6535.

HEMELAAR, J. et al. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **Aids**, v. 25, n. 5, p. 679-89, Mar 13 2011. ISSN 0269-9370.

HOFFMANN, C. et al. **HIV Medicine 2007 | Pathogenesis of HIV-1 Infection 2017**.

HOPE, T. J. HIV InSite. 2000.

INZAULE, S. C. et al. Stringent HIV Viral Load Threshold for Virological Failure Using Dried Blood Spots: Is the Perfect the Enemy of the Good? **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 71, n. 1, p. e30-3, Jan 1 2016. ISSN 1525-4135.

JOHANNESSEN, A. et al. Dried Blood Spots Perform Well in Viral Load Monitoring of Patients Who Receive Antiretroviral Treatment in Rural Tanzania. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 976-981, 2009. ISSN 1058-4838.

LEELAWIWAT, W. et al. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. **J Virol Methods**, v. 155, n. 2, p. 109-17, Feb 2009. ISSN 0166-0934 (Print)0166-0934.

LOFGREN, S. M. et al. Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. **Aids**, v. 23, n. 18, p. 2459-66, Nov 27 2009. ISSN 0269-9370.

MANAVI, K. A review on infection with human immunodeficiency virus. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 20, n. 6, p. 923-40, Dec 2006. ISSN 1521-6934 (Print)1521-6934.

MARCONI, A. et al. Evaluation of the Abbott Real-Time HIV-1 quantitative assay with dried blood spot specimens. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 1, p. 93-7, Jan 2009. ISSN 1198-743x.

MARX, P. A.; MUNN, R. J.; JOY, K. I. Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. **Lab Invest**, v. 58, n. 1, p. 112-8, Jan 1988. ISSN 0023-6837 (Print)0023-6837.

MBIDA, A. D. et al. Measure of viral load by using the Abbott Real-Time HIV-1 assay on dried blood and plasma spot specimens collected in 2 rural dispensaries in Cameroon. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 52, n. 1, p. 9-16, Sep 01 2009. ISSN 1525-4135 (Print)1525-4135.

MELLORS, J. W. et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1167-70, May 24 1996. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

MELONI, S. T. et al. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. **J Virol**, v. 78, n. 22, p. 12438-45, Nov 2004. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico** 2001.

_____. **PORTARIA Nº 59, DE 28 DE JANEIRO DE 2003** 2003.

_____. **Boletim Epidemiológico** 2013a.

_____. **Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV** 2013b.

_____. **Boletim Epidemiológico** 2015.

_____. **Boletim Epidemiológico** 2016.

_____. **Boletim Epidemiológico** 2017.

MONLEAU, M. et al. Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1562-6, Aug 2010. ISSN 0305-7453.

MONTEIRO, A. L. et al. A criação do Programa Nacional de DST e Aids como marco para a inclusão da idéia de direitos cidadãos na agenda governamental brasileira. **Rev. psicol. polít.**, v. 9, n. 17, p. 25-45, 06/2009 2009. ISSN 1519-549X.

NEOGI, U. et al. Dried blood spot HIV-1 RNA quantification: a useful tool for viral load monitoring among HIV-infected individuals in India. **Indian J Med Res**, v. 136, n. 6, p. 956-62, Dec 2012. ISSN 0971-5916 (Print)0971-5916.

OKULICZ, J. F. et al. Influence of the timing of antiretroviral therapy on the potential for normalization of immune status in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. **JAMA Intern Med**, v. 175, n. 1, p. 88-99, Jan 2015. ISSN 2168-6106.

PARKIN, N. T. Measurement of HIV-1 viral load for drug resistance surveillance using dried blood spots: literature review and modeling of contribution of DNA and RNA. **AIDS Rev**, v. 16, n. 3, p. 160-71, Jul-Sep 2014. ISSN 1139-6121.

REINKE, R.; STEFFEN, N. R.; ROBINSON, W. E., JR. Natural selection results in conservation of HIV-1 integrase activity despite sequence variability. **Aids**, v. 15, n. 7, p. 823-30, May 04 2001. ISSN 0269-9370 (Print)0269-9370.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, Apr 07 2000. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

ROQUEBERT, B. et al. [HIV genetic diversity and its consequences]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 57, n. 2, p. 142-8, Mar 2009. ISSN 0369-8114 (Print)0369-8114.

RUTSTEIN, S. E. et al. Dried blood spots for viral load monitoring in Malawi: feasible and effective. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124748, 2015. ISSN 1932-6203.

_____. Measures of viral load using Abbott RealTime HIV-1 Assay on venous and fingerstick dried blood spots from provider-collected specimens in Malawian District Hospitals. **J Clin Virol**, v. 60, n. 4, p. 392-8, Aug 2014. ISSN 1386-6532.

SATTENTAU, Q. J. et al. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. **J Virol**, v. 67, n. 12, p. 7383-93, Dec 1993. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a006841, Sep 2011. ISSN 2157-1422.

SHERMAN, M. P.; GREENE, W. C. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. **Microbes Infect**, v. 4, n. 1, p. 67-73, Jan 2002. ISSN 1286-4579 (Print)1286-4579.

STENE-JOHANSEN, K. et al. Dry Blood Spots a Reliable Method for Measurement of Hepatitis B Viral Load in Resource-Limited Settings. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166201, 2016. ISSN 1932-6203.

TAIEB, F. et al. First field evaluation of the optimized CE marked Abbott protocol for HIV RNA testing on dried blood spot in a routine clinical setting in Vietnam. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191920, 2018. ISSN 1932-6203.

TANG, N. et al. HIV-1 viral load measurement in venous blood and fingerprick blood using Abbott RealTime HIV-1 DBS assay. **J Clin Virol**, v. 92, p. 56-61, Jul 2017. ISSN 1386-6532.

TANURI, A. et al. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 253-8, Feb 1999. ISSN 0066-4804 (Print)0066-4804.

THIGPEN, M. C. et al. Antiretroviral preexposure prophylaxis for heterosexual HIV transmission in Botswana. **N Engl J Med**, v. 367, n. 5, p. 423-34, Aug 02 2012. ISSN 0028-4793.

UNAIDS. How AIDS changes everything. 2015.

_____. **Ending AIDS - Progress towards the 90-90-90 targets 2017.**

UTTAYAMAKUL, S. et al. Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. **J Virol Methods**, v. 128, n. 1-2, p. 128-34, Sep 2005. ISSN 0166-0934 (Print)0166-0934.

VAN SCHOONEVELD, T. et al. Clinical evaluation of a dried blood spot assay for atazanavir. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4124-8, Oct 2010. ISSN 0066-4804.

WATERS, L. et al. Evaluation of filter paper transfer of whole-blood and plasma samples for quantifying HIV RNA in subjects on antiretroviral therapy in Uganda. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 46, n. 5, p. 590-3, Dec 15 2007. ISSN 1525-4135 (Print)1525-4135.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing: interim technical update. 2014 2014.

WU, X. et al. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. **J Virol**, v. 73, n. 3, p. 2126-35, Mar 1999. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x.

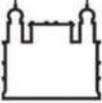
YU, X. et al. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. **J Virol**, v. 66, n. 8, p. 4966-71, Aug 1992. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x.

ZIDA, S. et al. Estimation of HIV-1 DNA Level Interfering with Reliability of HIV-1 RNA Quantification Performed on Dried Blood Spots Collected from Successfully Treated Patients. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 6, p. 1641-3, Jun 2016. ISSN 0095-1137.

ZIEMNIAK, C. et al. A sensitive genotyping assay for detection of drug resistance mutations in reverse transcriptase of HIV-1 subtypes B and C in samples stored as dried blood spots or frozen RNA extracts. **J Virol Methods**, v. 136, n. 1-2, p. 238-47, Sep 2006. ISSN 0166-0934 (Print)0166-0934.

ANEXOS

**ANEXO A - Quantificação de Carga Viral do HIV-1 por PCR RealTime
na plataforma Abbott m2000sp / m2000rt utilizando sangue seco
em papel de filtro (DBS)**

 <p>Ministério da Saúde FIUCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz</p>	 <p>LabAids Laboratório de Aids e Imunologia Molecular</p> <p>Pavilhão Leônidas Deane, 4º e 5º andares, salas 401, 413, 415 e 501. Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, CEP 21045-900. Tel: +55- 21 3865-8154/3865-8106/3865-8130/3865-8173 (fax) www.ioc.fiocruz.br labaid@ioc.fiocruz.br</p>
---	---

Título do POP: Quantificação de Carga Viral do HIV-1 por PCR Real Time na plataforma Abbott m2000sp / m2000rt utilizando sangue seco em papel de filtro (DBS)	Código LabAids	Versão 1.0
--	-----------------------	-------------------

Histórico

Versão	Criado por/ Data	Modificado por/ Data	Revisado por/ Data	Aprovado por	Data efetiva
1.0	Priscilla Guimarães				

Próxima revisão: após 1 ano da ultima aprovação

Sumário	Página
1.0 – Objetivos / Campo de aplicação	02
2.0 – Siglas e Definições	02
3.0 – Descrição/Procedimento	02
4.0 – Não conformidade e ação corretiva	07
5.0 – Manutenção e validação	07
6.0 – Descrição da modificação	07
7.0 – Anexos	07
8.0 – Referências	13
9.0 – De acordo com o POP	13

1.0 Objetivo / Campo de Aplicação:

Tornar às claras o procedimento a ser realizado para realização da metodologia *Real time PCR* para quantificação da carga viral do HIV-1 a partir de amostras coletadas em papel de filtro (DBS) utilizando as plataformas m2000sp e m2000rt comercializadas pela empresa Abbott.

2.0 Siglas e Definições:

RT - Real time
 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
 CI - Controle interno
 DBS - *Dried blood spot* (sangue seco)

3.0 Descrição/Procedimento:

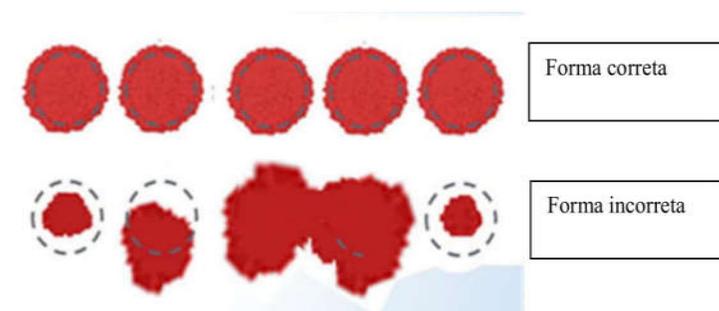
3.1 Coleta e Armazenamento de Amostras

Usar amostras de sangue coletadas em tubos de EDTA ou através da punção da ponta do dedo.
 Dispensar 70 µL de sangue total nos spots do DBS.

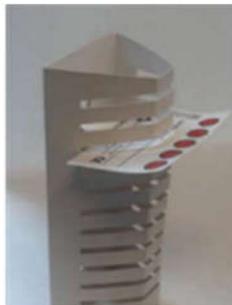
Deve ser utilizado o cartão tipo papel filtro com círculos de 12 mm de diâmetro para coleta de DBS Whatman 903 (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, Estados Unidos).



Certifique-se que cada círculo estará totalmente preenchido, mas não em excesso.



Seque o cartão completamente em temperatura ambiente, de preferência em um suporte para secagem do cartão, por 18 horas.



Embrar cada cartão em um saco com lacre com 2 a 3 pacotes de dessecante e armazenar a, no máximo, -35°C. Deve-se evitar múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento dos cartões, e, quando for utilizar as amostras, descongelar em temperatura ambiente.

3.2 Procedimentos Operacionais - Materiais Necessários para a Execução do Teste

- Abbott RealTime HIV-1 *Amplification Reagent Kit*
- Abbott RealTime HIV-1 *Calibrator Kit*
- Abbott RealTime HIV-1 *Control Kit*
- Abbott Real Time HIV-1 *sample prepare*

O procedimento é dividido em duas etapas, ambas automatizadas: extração, no equipamento Abbott *m2000sp*, e amplificação, no equipamento Abbott *m2000rt*.

3.2.1 Para o equipamento Abbott *m2000sp*

Área de Preparação de Amostra

São necessários os seguintes itens que são fornecidos pela empresa:

- Equipamento Abbott *m2000sp*
- Abbott *mSample* Preparation System (4 x 24 prep.)
- Recipientes de Reação de 5 mL
- Pipetas calibradas com capacidade para dispensar 20 a 1000 µL
- Tubos de amostras de 11,6 mm a 16 mm
- Tubos de amostras de 13 mm a 16 mm
- Ponteiros descartáveis de 200 µL e 1000 µL
- Placa Abbott de 96 cavidades
- Adesivos Abbott de vedação óptica
- Aplicadores Abbott de adesivos de vedação óptica
- Base de suporte Abbott *Splash-Free*
- Frasco para a mistura de reagentes
- Recipientes de Reagentes de 200 mL
- Placa Abbott de reação óptica de 96 cavidades
- Kit tampão DBS para sistema de preparo Abbott *mSample*
- Tubos para Mistura dos reagentes da Abbott

São necessários os seguintes itens que não são fornecidos pela empresa:

- DBS Whatman 903 (GE Healthcare Bio-Sciences)
- Ponteiras com filtro contra aerossol para pipetas de 20 a 1000 µL
- Agitador tipo Vortex
- CD-ROM Abbott RealTime HIV-1 m2000 System Aplicação Combinada
- Bloco de aquecimento a seco com blocos adequados para tubos de 15 mm de diâmetro)

3.2.2 Para o equipamento Abbott m2000rt

Área de Amplificação

- Equipamento Abbott m2000rt
- CD-ROM Abbott RealTime HIV-1 m2000 de Aplicação Combinada
- Abbott m2000rt *Optical Calibration Kit*

3.2.3 Outros Materiais

- Fluxo laminar de segurança biológica aprovado para trabalho com materiais infecciosos
- Água isenta de RNase

3.2.4 Precauções Quanto ao Procedimento

Os frascos dos Calibradores, Controle Interno, Controle Negativo, Controle Positivo Baixo e Controle Positivo Alto são destinados para uso único e devem ser descartados após o uso.

Usar as ponteiras de pipeta com filtro contra aerossol ou pipetas descartáveis uma única vez para pipetar amostras, CI ou reagentes de amplificação. Para evitar a contaminação do corpo da pipeta durante a dispensação, deve-se tomar cuidado para não encostar o corpo da pipeta na parte interna do tubo ou recipiente que contém a amostra. Recomenda-se o uso de ponteiras mais longas com filtro contra aerossol.

Para reduzir o risco de contaminação do ácido nucléico, limpe e desinfete os respingos de amostras com hipoclorito de sódio a 1,0% ou outro desinfetante apropriado.

Os Calibradores e Controles devem ser preparados junto com as amostras que serão testadas e seu uso é essencial para o bom desempenho do ensaio.

3.3 Protocolo de Ensaio: Equipamentos m2000sp e m2000rt

Antes de iniciar o ensaio, deve-se descongelar os controles e o controle interno do ensaio entre 15°C a 30°C ou entre 2°C a 8°C. Descongelar os calibradores entre 15°C a 30°C ou entre 2°C a 8°C somente se estiver realizando um lote novo de kit.

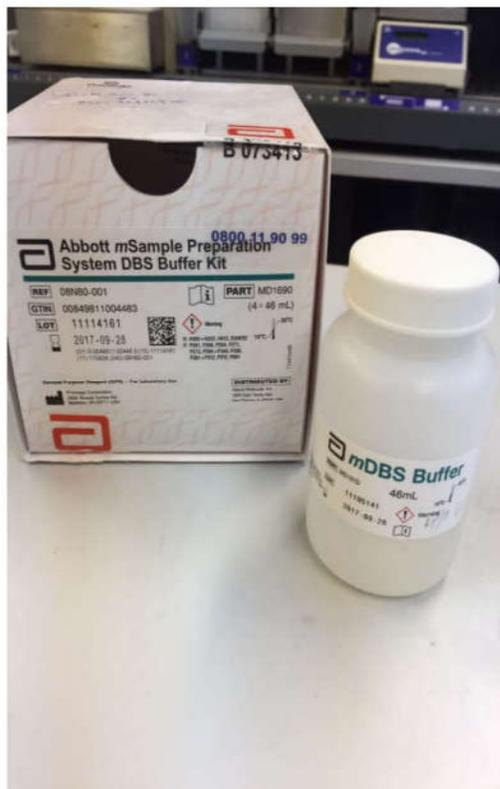
Uma vez descongelados, os controles, o controle interno e os calibradores do ensaio podem ser armazenados entre 2°C a 8°C por até 24 horas antes do uso.

Agitar (utilizando o Vortex) cada calibrador e cada controle de ensaio por três vezes durante 2 a 3 segundos antes do uso. Assegure-se de que o conteúdo de cada frasco esteja no fundo após a agitação, batendo levemente os frascos na bancada para levar o líquido ao fundo do frasco.

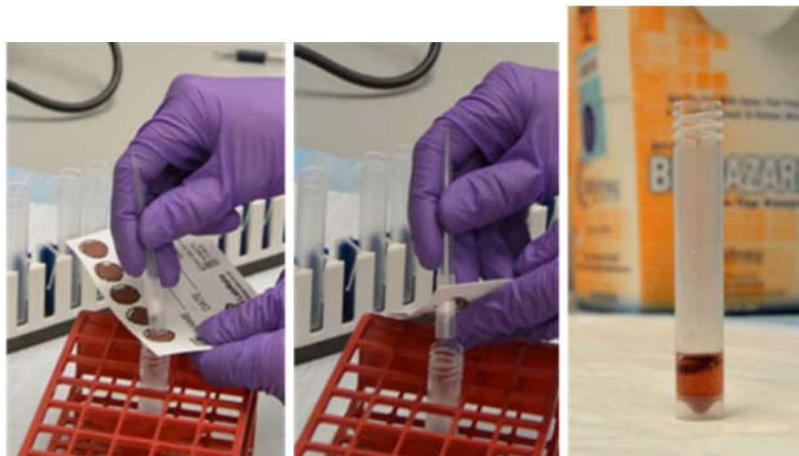
As etapas a seguir são realizadas na área de nível de segurança 2 (NB2).

3.3.1 Pré- tratamento das amostras:

Dispensar 1,3 mL de tampão de lise DBS (*mLysis*) em cada tubo de mistura principal a ser utilizado com as amostras de DBS.



Segurar o papel de filtro com DBS acima do tubo de mistura principal com tampão de lise para DBS, separando um disco do cartão com uma tesoura limpa e estéril para cada amostra e dispensá-lo em direção ao fundo do tubo de mistura principal, certificando-se que o disco DBS está totalmente imerso no tampão DBS. Esta etapa pode ser adaptada retirando-seo *spot* com uma ponteira quando o *spot* for destacável. Deve-se utilizar uma ponteira para cada *spot*.



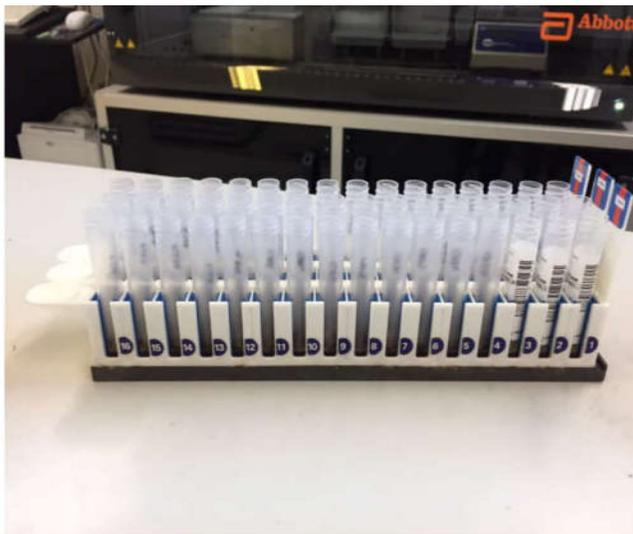
Em alguns momentos da reação pode haver formação de bolhas nos reagentes, que interferem na dispensação do material pelo equipamento. Misturar manualmente os tubos de amostra para garantir que os discos de DBS estejam embebidos com tampão DBS e para reduzir as bolhas.

Ajustar a temperatura do bloco de aquecimento a seco em 55°C.

Quando o bloco atingir 55 °C, coloque os tubos de mistura principal (com os espécimes de DBS) no bloco e incube por 30 minutos (\pm 2 minutos).

Após a conclusão da incubação, misture gentilmente os tubos de amostra DBS e depois coloque-os nos suportes de amostra Abbott m2000sp contendo o código de barras para o protocolo DBS.





3.3.2 Extração das amostras

Descongelar os reagentes de amplificação entre 15°C a 30°C ou entre 2°C a 8°C e armazenar entre 2°C a 8°C até que sejam necessários para o procedimento da mistura principal de amplificação. Uma vez descongelados, os reagentes de amplificação poderão ser armazenados entre 2°C a 8°C por até 24 horas se não forem utilizados imediatamente.

Inverter delicadamente os frascos dos reagentes utilizados na extração das amostras para garantir uma solução homogênea. Se observar cristais em qualquer um dos frascos de reagente ao abri-los, deixe o reagente entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente até que os cristais desapareçam. Não use os reagentes até que os cristais tenham se dissolvido.

Agitar cada controle interno no Vortex três vezes por 2-3 segundos antes do uso.

Usar uma pipeta de precisão calibrada para adicionar 500 µL de Controle Interno (CI) a cada frasco de Tampão *mLysis*. Misture invertendo suavemente o recipiente de 5 a 10 vezes para minimizar a formação de espuma.



Carregar os reagentes do *Abbott mSample Preparation System* e a placa Abbott de 96 cavidades na mesa de trabalho Abbott m2000sp conforme descrito no “Manual de Operações do Abbott m2000sp”, seção de “Instruções de Operação”.



Na tela “Protocolo”, selecione o arquivo de aplicação apropriado correspondente ao volume da amostra em teste. Inicie o protocolo de extração da amostra conforme descrito no “Manual de Operações do Abbott m2000sp”, seção de “Instruções de Operação”. O “Manual de Operações do Abbott m2000sp” se encontra instalado nos computadores que compõem os sistemas Abbott m2000sp e m2000rt. Uma versão impressa está disponível também no arquivo de documentos do LABAIDS.

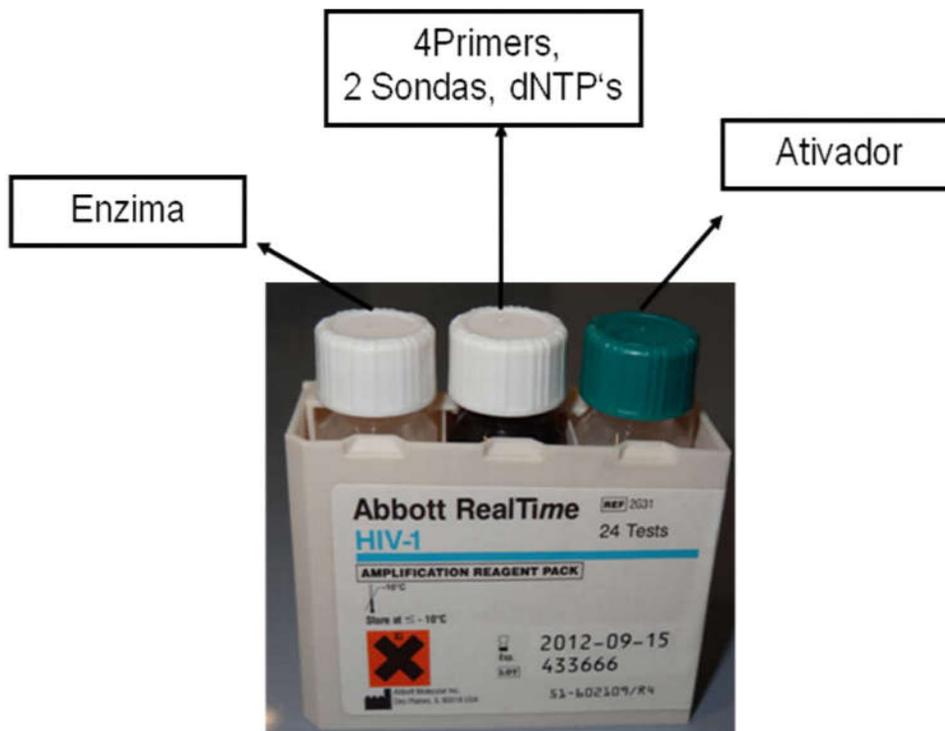
Inserir os valores específicos dos lotes do calibrador (necessário caso uma curva de calibração não tenha sido armazenada no m2000rt) e do controle no “Sample Extraction”: campos “Worktable Setup”, “Calibrator and Control”. Os valores dos lotes estão especificados no cartão de cada kit de controle e calibrador Abbott RealTime HIV-1.

Após o término da extração, que leva cerca de 1 hora e 30 minutos se forem 48 amostras e 3 horas se forem 96 amostras, é adicionado então o reagente de amplificação. O mesmo deve ser adicionado em até uma hora após o término da preparação da amostra.

NOTA: Troque as luvas antes de manusear os reagentes de amplificação.

3.3.3 Adição do reagente de amplificação,

Carregar os reagentes de amplificação e o frasco da mistura principal na mesa de trabalho do m2000sp após o término da extração de amostras.



Cada embalagem de Reagente de Amplificação permite até 24 reações, totalizando por kit 96 reações.

Antes de abrir os reagentes de amplificação, assegure-se de que os conteúdos estejam no fundo dos frascos, batendo-os levemente sobre a bancada, na posição vertical.

Remover e descartar as tampas dos frascos de amplificação.

Na tela "Protocol", selecione o arquivo de aplicação apropriado correspondente ao volume da amostra em teste. Inicie o protocolo de adição da mistura principal do Abbott m2000sp.

Lacrar a placa Abbott de reação óptica de 96 cavidades após o instrumento Abbott m2000sp ter concluído a adição das amostras e da mistura principal de acordo com o "Manual de Operações do Abbott m2000sp", seção "Instruções de Operação".



Colocar a placa de reação óptica lacrada na base de suporte “Splash Free” para transferir para o instrumento Abbott m2000rt.

3.3.4 Amplificação na sala de Biologia Molecular

NOTA: O instrumento Abbott m2000rt requer 15 minutos de aquecimento.

Transferir a placa de 96 poços com as amostras e os reagentes de amplificação para a área da Biologia Molecular (sala BM).

Colocar a placa Abbott de 96 cavidades no instrumento Abbott m2000rt.



Na tela Protocolo, selecione o arquivo de aplicação apropriado correspondente ao volume da amostra em teste. Inicie o protocolo Abbott RealTime HIV-1 conforme descrito no “Manual de Operações do Abbott m2000rt”, seção “Instruções de Operação”.

3.4 Calibração do Ensaio

Consultar os “Manuais de Operações dos Instrumentos Abbott m2000sp e m2000rt, seção “Instruções de Operação”, para obter a descrição detalhada sobre como realizar a calibração do ensaio.

Uma curva de calibração é necessária para quantificar a concentração de RNA do HIV das amostras e dos controles. Dois calibradores do ensaio são processados em triplicatas para gerar uma curva de calibração (concentração de HIV-1 versus o *threshold cycle* [Ct] (ciclo limiar), no qual um nível reativo do sinal fluorescente é detectado). A inclinação e a interceptação da curva de calibração são calculadas e armazenadas no instrumento. A concentração de RNA do HIV-1 em uma amostra é calculada a partir da curva de calibração armazenada. Os resultados são automaticamente apresentados na estação de trabalho do m2000rt.

Seguir o procedimento dos protocolos de extração de amostra, adição da mistura principal, amplificação e detecção conforme estabelecido no “Manual de Operações do Abbott m2000”.

Uma vez que a calibração do Abbott RealTime HIV-1 for aceita e armazenada, ela pode ser utilizada por seis meses. Durante este tempo, todas as amostras subsequentes podem ser testadas sem calibração adicional, a menos que:

- Um kit de Abbott RealTime HIV-1 Amplification Reagent com um novo número de lote seja utilizado.
- Um Sistema Abbott *m* Sample Preparation (4 x 24 Prep.) com um novo número de lote seja utilizado.
- Um arquivo de aplicação do Abbott RealTime HIV-1 para um volume diferente de amostra seja utilizado.

3.5 Detecção de Inibição

Um parâmetro de validade do ensaio, *threshold cycle* [Ct] (ciclo limiar) do controle interno é estabelecido durante o processamento de calibração.

Uma quantidade constante e pré-definida de controle interno é introduzida em cada amostra, calibrador e controle no início da preparação da amostra e medida no instrumento Abbott m2000rt para demonstrar o processamento adequado da amostra e a validade do ensaio. O controle interno compreende uma sequência de RNA não relacionada à sequência-alvo do HIV-1.

O ciclo de amplificação mediano no qual o sinal fluorescente da sequência alvo do CI é detectado nas amostras de calibração estabelece uma faixa de validade Ct do CI a ser atendida por todas as amostras processadas em seguida.

Uma sinalização de erro de controle é exibida quando uma amostra ou controle não atende a essa especificação. Consultar o “Manual de Operações do m2000rt” para explicação sobre ações corretivas para a sinalização de erro de controle. As amostras cujos valores Ct do CI que excedem a faixa estabelecida devem ser analisadas novamente, começando com a preparação da amostra.

3.6 Controles Negativo e Positivo

Um controle negativo, um controle positivo baixo e um controle positivo alto são incluídos em cada teste para validar o procedimento. Os valores específicos para o lote do controle positivo baixo e do controle positivo alto estão especificados no cartão de cada kit de controle Abbott RealTime HIV-1 e devem ser inseridos na ordem de teste quando o processamento é realizado.

Uma sinalização de erro de controle é exibida quando um resultado do controle está fora da faixa. Consultar o Manual de Operações do Abbott m2000rt para explicação sobre as ações corretivas para a sinalização de erro de controle.

A presença do HIV-1 não deve ser detectada no controle negativo. A detecção de RNA do HIV-1 no controle negativo é indicativa de contaminação por outras amostras ou pelo produto amplificado introduzido durante a preparação da amostra ou durante a preparação da placa de reação óptica de 96 cavidades.

3.7 Resultados

A concentração de RNA do HIV-1 em uma amostra ou controle é calculada a partir da curva de calibração armazenada, que é gerada para cada lote de kit de modo individual. O instrumento Abbott m2000rt apresenta automaticamente os resultados no computador de trabalho que fica acoplado ao equipamento e exportados em arquivo de texto para um Cd, onde o resultado é enviado para o sistema de liberação de resultados do Ministério da Saúde e uma cópia é armazenado em um drive de backup.

Os resultados do ensaio podem ser expressos em cópias/mL, log [cópias/mL], Unidades Internacionais (UI)/mL ou log [UI/mL]; (1 UI = 0,58 cópia, 1 cópia = 1,74 UI). Para a técnica realizada em DBS a faixa de detecção do RNA viral é de 839 a 10.000.000 cp/ml.

3.7.1 Critérios de Rejeição

- Os resultados das corridas são avaliados automaticamente pelo programa do instrumento Abbott, que calcula os dados a partir da curva de calibração salva no equipamento pelo software instalado e, caso haja alguma não conformidade, o evento é sinalizado através de um código de erro, onde o operador pode verificar no “Manual de operações do m2000” ou clicando duas vezes na amostra com erro. Ao lado, abrirá uma caixa de mensagem indicando o significado do código de erro.

Algumas situações especiais são:

- Suspeita de troca de amostra e problema na identificação: o operador deve solicitar nova amostra.

- Se os controles positivos ou negativos estiverem fora da faixa, todas as amostras e controles desse processamento devem ser reprocessados, desde a preparação da amostra. Para evitar contaminação do sistema m2000, limpe os equipamentos com gaze primeiramente embebida com hipoclorito de sódio, seguida de uma gaze com água e por último uma gaze com álcool antes e depois de cada rotina e repita o processamento de controles e amostras seguindo o POP.

- Corridas inválidas devem ser repetidas

- Caso ocorra alguma observação indicada pelo sistema, o técnico deve consultar o manual técnico existente nos computadores da plataforma m2000 e/ou ligar para o *call center* (para ser atendido pelo consultor técnico) – vide item 4.0.

Valores de Referência da técnica

Limite inferior de detecção: 839 cópias/ml ou 2,92 log₁₀.

Limite superior de detecção: 10.000.000 cópias/ml ou 7,00 log₁₀.

4.0 Não Conformidade / Ação Corretiva:

Qualquer procedimento realizado de forma distinta ao descrito neste POP será considerado “não conformidade”. Deverá ser preenchido o formulário da não conformidade que se encontra em anexo a este POP (Registro de Não Conformidades e Ação Corretiva).

Ação corretiva: Cumprimento da documentação ou ação exigida.

Caso haja qualquer problema entrar em contato com a empresa junto ao telefone 08007020711.

5.0 Manutenção

Se dá através de agendamentos realizados junto a empresa Abbott, por meio do telefone 08007020711, com frequência anual. Caso haja algum problema com a rotina, deve-se realizar contato com a empresa para abertura de chamados que possuem número de registro e podem ser acompanhados, facilitando o rastreamento de antigos e possíveis novos problemas. As listas para preenchimento dos itens das manutenções que devem ser realizadas rotineiramente encontram-se no item 7.0 – Anexos.

6.0 Descrição da modificação

Não se aplica - Primeira Versão

Registro de manutenção do sistema *m2000rt E162*

Mês _____ Ano _____ N° de série _____

SEMANAL	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
Limpar as superfícies do instrumento (Não usar solventes orgânicos)					
Realizado por					
Data					

MENSAL	Realizado Por	Data
Executar a Calibração do segundo plano		

SEMESTRAL	Realizado por	Data
Executar a calibração da região de interesse		
Executar a calibração do segundo plano		
Executar a calibração da uniformidade		
Executar calibração de corante puros		
Calibração FAM TM		
Calibração JOE TM		
Calibração NED TM		
Calibração ROX TM		
Calibração SYBR ^R		
Calibração TAMRA TM		
Calibração VIC ^R		
Calibração Cy TM 5		

POR DEMANDA		
	Realizado por	Data
Descontaminar o bloco térmico		
Limpar o suporte da placa		
Limpar a base de suporte à proa de respingo		
Fazer backup do sistema		
Limpar o bloco térmico		

Registro de manutenção do sistema m200096sp

DIÁRIA	Mês							Ano					Nº de série																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Apertar as conexões de válvulas																															
Apertar os parafusos da seringa																															
Apertar os parafusos de trava do êmbolo																															
Verificar se o sistema de líquidos apresenta vazamentos.																															
Limpar os cones de DiTis																															
Limpar a porta de segurança																															
Limpar a mesa de trabalho																															
Limpar a estação de descarte																															
Limpe o resfriador do deck de saída																															
Esvaziar o recipiente de descarte de líquidos																															
Esvaziar o recipiente de descarte de sólidos																															
Reabastecer o recipiente de líquido do sistema																															
Esvaziar o sistema																															

SEMANAL	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
Limpar o recipiente de líquidos e a tubulação do sistema					
Limpar o recipiente de descarte de líquidos					
Limpar transportadores e racks					
Limpar a cabeça do scanner de POsID (somente na série G)					
Limpar a guia do Braço					
Limpar suporte de reagente da mistura principal					
Limpar o interior do tampo (se aplicável)					

Mensal: Desligar e ligar novamente a energia do CCS			
Janeiro		Julho	
Fevereiro		Agosto	
Março		Setembro	
Abril		Outubro	
Maio		Novembro	
Junho		Outubro	

POR DEMANDA	DATA
Descontaminar o deck de saída	
Limpar o subsistema de 1ml	
Fazer backup do sistema	

Inspeção por

Data

Registro de Não conformidade – Registrar também substituição de peças

Data	Problema ou Descrição da Ocorrência	Descrição da Ação Corretiva ou Reparo Realizado	Rubrica	Data

