

Dinâmica da viremia do HIV e da soroconversão de anticorpos em doadores de plasma: implicações para diagnóstico e estadiamento da infecção primária pelo HIV

Eberhard W. Fiebig^{a,b}, David J. Wright^c, Bhupat D. Rawal^d, Patricia E. Garrett^e, Richard T. Schumacher^e, Lorraine Peddada^f, Charles Heldebrant^f, Richard Smith^g, Andrew Conrad^g, Steven H. Kleinman^{c,h} e Michael P. Busch^{a,d,i}

Objetivos: A caracterização de infecção primária pelo HIV através da análise de amostras seriadas de plasma de pessoas recém-infectadas, usando múltiplos ensaios virais padronizados.

Desenho do estudo: Um estudo retrospectivo envolvendo dois conjuntos de amostras armazenadas de doadores de plasma infectados pelo HIV. (A) 435 amostras com resultado reagente por imunoenensaio enzimático anti-HIV, provenientes de 51 doadores, obtidas entre 1984-1994; (B) 145 amostras com resultado reagente em ensaio de triagem de antígeno p24, provenientes de 44 doadores, obtidas no período entre os anos de 1996-1998.

Cenário: Duas empresas estadounidenses de hemoderivados.

Principais medidas de desfecho: O período de tempo do surgimento de marcadores de HIV-1 e as concentrações de carga viral durante a infecção primária pelo HIV.

Resultados: O padrão de surgimento sequencial de marcadores virais nos painéis 'A' foi altamente consistente, permitindo a definição e a estimativa da duração de seis estágios sequenciais. A partir dos painéis 'B', a carga viral na soroconversão do antígeno p24 foi estimada por análise de regressão em 10.000 cópias/mL (IC 95% 2000-93000) e a taxa de replicação de HIV em 0,35 log cópias/mL/dia, correspondente ao tempo de duplicação na fase de pré-soroconversão de 20,5 h (IC 95% 18,2-23,4 h). Consequentemente, um teste de RNA com sensibilidade de 50 cópias/mL detectaria a infecção pelo HIV aproximadamente 7 dias antes de um teste de antígeno p24, e 12 dias antes de um teste sensível de anticorpos anti-HIV.

Conclusão: O surgimento sequencial da reatividade nos testes permite a classificação de infecção primária por HIV-1 em estágios laboratoriais distintos, que pode facilitar o diagnóstico de infecção recente e a estratificação de pacientes incluídos em ensaios clínicos. A análise quantitativa das taxas de replicação pré-soroconversão de HIV é útil para estimar a eficácia e o valor preditivo de ensaios que visem à infecção primária pelo HIV.

@ 2003 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2003, 17:1871 –1879

Palavras-Chave: HIV, teste de ácido nucleico, infecção primária, antígeno p24, janela imunológica

Do a Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, CA, USA; ^bSan Francisco General Hospital Medical Center, San Francisco, CA, USA; ^cWestat, Inc., Rockville, MD, USA; ^dBlood Centers of the Pacific, San Francisco, CA, USA; ^eBoston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA, USA; ^fAlpha Therapeutic Corporation, Los Angeles, CA, USA; ^gNational Genetics Institute, Los Angeles, CA, USA; ^hUniversity of British Columbia, Victoria, BC, Canada; e ⁱBlood Systems, Inc., Scottsdale, AZ, USA.

Correspondência e solicitação de reimpressão: Michael P. Busch, MD, PhD, Blood Centers of the Pacific, 270 Masonic Avenue, San Francisco, CA 94118, USA.

Tel: +1 415 749 6615; fax: +1 415 775 3859; e-mail: mpbusch@itsa.ucsf.edu

Recebido: 1 Agosto de 2002; revisado: 14 de fevereiro de 2003; aceito: 12 de março de 2003.

DOI: 10.1097/01.aids.0000076308.76477.b8

ISSN 0269-9370 & 2003 Lippincott Williams & Wilkins

Introdução

Uma compreensão detalhada do curso da viremia e soroconversão durante a infecção primária por HIV é um pré-requisito para aperfeiçoar algoritmos de triagem e diagnóstico [1-4], e poderá prover dados de referência úteis para ensaios clínicos, por exemplo, proporcionando uma nova base para a estratificação de pacientes em diferentes braços do estudo.

Em virtude da dificuldade em se obter amostras de sangue que representem a fase inicial da infecção aguda pelo HIV em pacientes clínicos, já que a maioria dos pacientes não procura atendimento médico nas primeiras semanas ou meses após a infecção, recorreu-se às amostras armazenadas, amostras de plasma congeladas obtidas de doadores de plasma que, por causas não relacionadas à doação, foram infectados pelo HIV e viram-se impedidos de fazer mais doações. Como doadores de plasma fazem doações em média duas vezes por semana, e cada doação é testada para HIV e é guardada por 60 dias antes de ser liberada. As amostras armazenadas dos doadores oferecem um registro único da infecção em intervalos de tempo anteriores a exposição ao vírus até a soroconversão e o período subsequente.

Com o objetivo de elaborar uma linha do tempo detalhada do aparecimento de marcadores da infecção pelo HIV RNA, antígeno do HIV-1 (p24), anticorpos anti-HIV e reatividade das bandas do Western blot, foram utilizados estes ensaios em um painel de doadores de plasma composto de 435 amostras provenientes de 51 doadores. Um segundo grupo separado, de 145 amostras provenientes de 44 doadores de plasma representando apenas o período anterior a soroconversão, foi analisado em paralelo com ensaios de HIV-RNA e de antígeno p24 para desenvolver um modelo que permitiria prever com quanta antecedência os testes quantitativos de RNA detectam infecção em face à reatividade ao antígeno p24.

Materiais e Métodos

Painéis de doadores de plasma em soroconversão

As doações de plasma (600-800 ml) proveniente de doadores de plasma foram coletadas de maneira habitual em intervalos aproximados de duas vezes por semana, e armazenados a -20°C ou menos. Logo após a confirmação da soroconversão ou presença do antígeno p24, os doadores foram permanentemente impedidos de fazer novas doações, e todas as doações de plasma em quarentena, por exemplo, doações retidas habitualmente, sem distribuição, por um período de espera de 60 dias, foram retiradas do armazenamento para a constituição de painéis com amostras de plasma sequencialmente obtidas de doadores em soroconversão. Cada doação foi rapidamente descongelada, separada em alíquotas e as alíquotas novamente congeladas a -20°C ou menos. Alíquotas de doações em série foram codificadas, compiladas e mantidas em painéis anônimos, não vinculados individualmente aos doadores. Registros de dados de visita de cada doador, assim como os resultados de

testes de laboratório de cada alíquota de plasma foram inseridos em um banco de dados computadorizado. O painel de amostras foi obtido da Alpha Therapeutic Corporation (Los Angeles, CA, USA) e Boston Biomedica (West Bridgewater, MA, USA).

Foram examinados dois grupos de painéis de doadores. (A) O primeiro grupo de 435 amostras, proveniente de 51 doadores que apresentaram soroconversão de acordo com os resultados obtidos em ensaios de triagem de anticorpos anti-HIV, no período entre junho de 1984 e outubro de 1994. As amostras incluídas nos painéis foram obtidas várias semanas antes da soroconversão e foram coletadas por um período de até seis meses após a detecção de anticorpos anti-HIV. A mediana do intervalo entre as doações foi de cinco dias (variando de 1-204 dias). (B) O segundo grupo de 145 amostras representa doações em série de 44 doadores de plasma que se tornaram HIV positivo no período entre junho de 1996 e março de 1998, após a introdução da rotina de triagem do antígeno p24 do HIV. As amostras foram caracterizadas, adicionalmente, por triagem estadiamento com uma análise de HIV-RNA, e foram selecionadas para representar somente o período pré-soroconversão. A presente análise incluiu as amostras que obtiveram resultado igual ou superior a 100 cópias/mL (sensibilidade analítica do ensaio) em um ensaio de HIV-1 RNA utilizando o método que emprega uma reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) durante o primeiro pico de viremia e reatividade no ensaio de anticorpos anti-HIV. A mediana dos intervalos entre as doações foi de 4 dias (variando de 1 a 10 dias).

Ensaio para marcadores do HIV-1

Painéis de doadores foram testados em paralelo com uma série de ensaios comerciais para a detecção de ácidos nucleicos e de sorologia do HIV de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os ensaios de quantificação de HIV RNA por PCR utilizados foram o conjunto diagnóstico Amplicor HIV Monitor (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) em um equipamento PCR Perkin-Elmer GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA) ou o ensaio SuperQuant desenvolvido pelo *National Genetics Institute* (Los Angeles, CA, USA). O ensaio para a detecção do antígeno p24 do HIV-1 foi realizado utilizando um ensaio imunoenzimático (EIA; Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) aprovado pelo *Food and Drug Administration* (USA), sem a etapa da dissociação do complexo imune. Anticorpos anti-HIV foram detectados usando um ensaio imunoenzimático indireto (formato "sanduíche") de Segunda Geração (Genetic Systems Corp, Redmond, WA, USA) e um ensaio imunoenzimático "sanduíche" HIV-1/HIV-2 de terceira geração com sensibilidade para IgM estabelecida (Abbott no. 3A77; Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). As amostras que reagiram ao ensaio imunoenzimático foram testadas por Western blot (Cambridge Biotech, distribuído pela Ortho Diagnostics, Raritan, NJ, USA).

Desenvolvendo um modelo de relação entre os níveis de HIV-1-RNA e a razão sinal/ponto de corte do antígeno p24 no período pré-soroconversão

Esta análise baseou-se no grupo 'B' de painéis de doadores de plasma. Os resultados em log do HIV RNA e razão sinal/ponto de corte (S/CO) foram plotadas contra dia de coleta da amostra. A razão S/CO do antígeno p24 representa a intensidade da reação em relação a um nível de ponto de corte, de modo que as relações entre S/CO iguais ou maiores que 1 (de forma equivalente, as razões S/CO do antígeno p24 \log_{10} maiores ou iguais a 0) são consideradas como sendo reativas ao antígeno p24. O primeiro dia de detecção de RNA superior a 100 cópias/mL pelo ensaio quantitativo de HIV-RNA foi definido arbitrariamente como dia 0 na linha do tempo para cada doador de plasma. Esta definição tem um impacto no cálculo do coeficiente linear e sua correlação no modelo, mas não afeta de maneira substancial os objetivos da análise, pois consideramos somente as diferenças na linha do tempo. De cada doador foram incluídos resultados para todas as amostras 'iniciais', as quais foram definidas como sendo aquelas amostras, em que o HIV RNA \log_{10} era maior do que 4,45, e incluindo a primeira amostra, mantendo 97 de um total de 145 amostras para os cálculos do modelo. O ponto de corte foi decidido após a inspeção visual do gráfico dos níveis de HIV-RNA ao longo do tempo; acima deste ponto de corte de carga viral não havia mais um aumento consistente nos níveis de RNA, indicando que as taxas de replicação viral foram mais baixas, e foram inconsistentes com a dinâmica do aumento da carga viral, caracterizando a fase inicial do aumento da viremia. A partir dos dados, desenvolvemos um modelo de regressão dos níveis de HIV-RNA e da razão S/CO do antígeno p24 em função do tempo (ver seção de Avaliação Estatística). Para cada doador, o modelo permitiu a predição de: (i) o nível de HIV-RNA na soroconversão do antígeno p24, por exemplo, quando a razão S/CO do antígeno p24 \log_{10} for igual a 0; (ii) o tempo, em dias, quando ocorre a soroconversão do antígeno p24, relativo ao primeiro dia possível de detecção de RNA; e (iii) o tempo, em dias, relativo à soroconversão do antígeno p24, quando o HIV RNA alcança os níveis definidos durante a fase inicial de aumento da viremia. Para as predições acima citadas dos níveis de RNA e de diferenças de tempo, intervalos de confiança de 95% foram calculados utilizando um *bootstrap* paramétrico [5]. Observe que este cálculo geralmente extrapola além dos dados disponíveis às vezes extrapolando além do tempo previsto quando a soroconversão do antígeno p24 ocorre, frequentemente extrapolando antes do tempo previsto, quando os níveis de HIV-RNA são iguais a 100, e sempre extrapolando antes do tempo previsto quando HIV RNA alcança níveis definidos inferiores a 100). Assim, o modelo se apoia no pressuposto da linearidade (na escala logarítmica). Também, o tamanho relativamente pequeno da amostra (97 amostras de 44 doadores) limita a precisão do modelo na predição das "reais" taxas de replicação viral durante a fase de aumento da viremia. Além disso, a representação desigual de doadores no modelo (número de amostras por

doador variou de um até quatro) poderia potencialmente introduzir um viés, se houvesse uma relação entre a taxa de replicação viral de um doador e o seu número de amostras. Apesar destas limitações, o modelo oferece uma aproximação das relações dos níveis de HIV-RNA e a razão S/CO do antígeno p24 ao longo do tempo.

Avaliação Estatística

Estatística descritiva e comparações entre os grupos (teste não-paramétrico de Mann-Whitney estratificado e Kruskal-Wallis estratificado) foram calculados (SAS Institute, Cary, NC, USA). A significância estatística foi obtida se $P < 0,05$. A duração dos períodos da janela específicos de cada ensaio foi estimada adaptando um modelo paramétrico de Markov aos dados, conforme descrito anteriormente [6]. A adequação do modelo de Markov para estes dados foi confirmada utilizando um modelo não paramétrico semi-Markov e um modelo que permitiu o rastreamento (correlação positiva entre tempos entre a sequência de eventos [7]). As relações entre HIV RNA e a razão S/CO do antígeno p24 ao longo do tempo foram avaliadas com um modelo de regressão linear de medidas repetidas bivariadas [8]. Através da equação, cada doador apresentará um coeficiente linear (intercepto da reta no eixo y) e um coeficiente angular (inclinação da reta de regressão). As inclinações permitem que cada doador tenha uma única taxa de acréscimo ou 'tempo de duplicação' para RNA e para o antígeno p24. O modelo de correlação inclui correlação entre o intercepto e uma correlação entre as inclinações (por exemplo, o antígeno p24 no dia 0 é correlacionado com o RNA no dia 0, o 'tempo de duplicação' para RNA é correlacionado com o 'tempo de duplicação' para o antígeno p24). Os parâmetros do modelo foram calculados usando o software estatístico SAS (SAS Institute).

Resultados

Estágios iniciais da infecção pelo HIV

De 435 amostras sequenciais de 51 doadores de plasma que soroconverteram (painéis 'A'), 113 amostras foram não reativas em todos os ensaios empregados; as 322 amostras restantes foram reativas em um ou mais ensaios. O padrão da reatividade dos ensaios em amostras seriadas foi altamente consistente para cada doador, o que nos estimulou a propor os seguintes estágios laboratoriais da infecção primária por HIV-1: estágio I: HIV presente em amostras de sangue, apenas ensaio de RNA positivo; estágio II: Testes positivos de RNA e antígeno p24 do HIV-1, não reativo ao ensaio de anticorpos anti-HIV; estágio III: RNA, antígeno do HIV-1 (p24) e imunoensaio enzimático de 3^o Geração¹ reagentes, porém Western blot sem bandas específicas de HIV-1; estágio IV: idem ao estágio III, mas, com o padrão de Western blot indeterminado, ou seja, a presença de bandas de Western blot específicas de HIV-1 que falham em cumprir critérios de interpretação para Western blot reativo definido pela *USA Food and Drug*

¹ Nota de tradução: "imunoensaio enzimático capaz de detectar IgM" foi traduzido como "imunoensaio enzimático de Terceira Geração".

Administration como a reatividade para duas das seguintes das três bandas: p24, gp 41, gp 120/160; estágio V: idem ao estágio IV, mas com padrão de Western blot reativo, exceto pela ausência de reatividade da banda p31 (*pol*); estágio VI: idem ao estágio V, porém com padrão completo de reatividade no Western blot incluindo a banda p31.

A figura 1 demonstra como as amostras reativas representam todos os seis estágios, e apresenta detalhes de reatividade do ensaio para painéis do doador representativos. A Tabela 1 apresenta projeções da duração de cada estágio proveniente da adaptação de um modelo paramétrico de Markov para os dados. Particularmente, a duração projetada de cada um dos estágios I-IV é relativamente curta, durando em média somente de 3 a 5 dias, enquanto o estágio V (Western blot positivo sem banda p31) é estimado durar 69,5 dias em média. Nenhum limite de duração foi definido para o estágio final VI, caracterizado por um padrão completo de bandas no

Western blot. Com base nos resultados publicados anteriormente, o estágio VI pode ser subdividido ainda em infecção recente versus infecção crônica inicial, conforme ilustrado na Fig. 2.

Inerente ao conceito proposto de estadiamento em laboratório a atribuição do estágio é dependente da sensibilidade do ensaio. O imunoenensaio enzimático (EIA) de segunda geração, menos sensível, se torna reativo, em média, uma semana após o imunoenensaio enzimático (EIA) de 3º Geração. Amostras com padrões de bandas indeterminados no Western blot (estágio IV) reagiram de forma inconsistente com este imunoenensaio enzimático (EIA) (nove de 39 amostras, 23%); entretanto, foram observadas taxas de reatividade mais elevadas para amostras classificadas como estágio V (118 de 143, 83%) e VI (46 de 46, 100%).

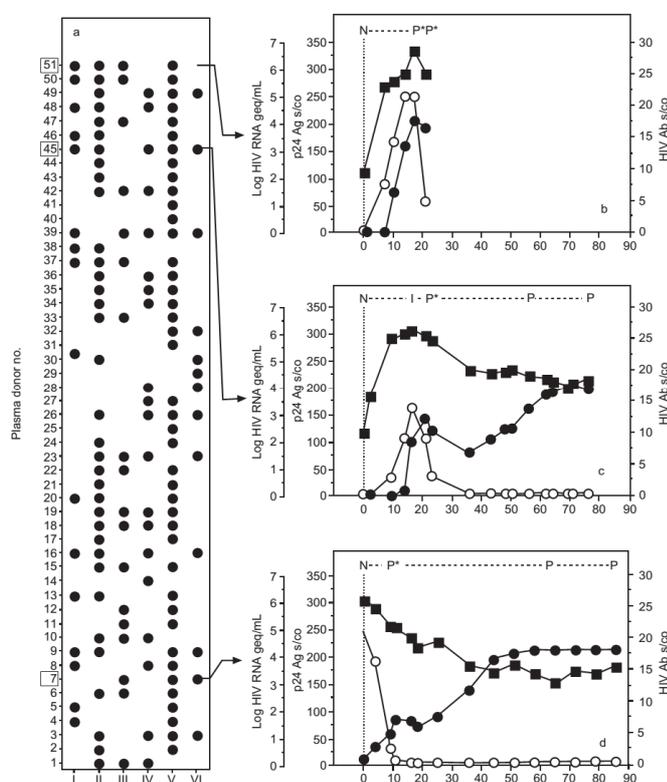


Fig. 1. (a) Visão geral de padrões de reatividade de amostra (correspondente aos estágios I-VI) para cada um dos 51 doadores de plasma dos painéis 'A'. O número médio de amostras por estágio para cada painel de doador variou de um para dois para os estágios de curta duração I-IV e foi mais elevado (média 3,5) para os estágios de maior duração V e VI. (b-d) Resultados de cada teste, por exemplo, HIV-RNA log₁₀ cópias/mL cópias/mL (quadrados preenchidos), razão S/CO do antígeno p24 (Ag) (círculos não preenchidos), razão S/COe de anticorpos anti-HIV por imunoenensaio enzimático (EIA) de 3º Geração (círculos preenchidos) e padrões de banda de Western blot anti-HIV para três painéis representativos de doador de plasma [doadores 51, 45, e 7 em (a)]. Os códigos de letras simples, nos gráficos indicam o surgimento de um novo padrão de banda de Western blot (N, não reativo; I, indeterminado; P*, reativo sem p31; P, totalmente reativo). Ab, Anticorpo. (b) O padrão de reatividade em um doador que contribuiu com seis amostras que representam o estágio I até o início do estágio V (Western blot P*), o qual é alcançado, neste caso, no dia 17 a partir da primeira amostra detectável lde RNA. (c) Os resultados para 17 amostras que representam estágios I-VI (reatividade completa do Western blot), o qual é alcançado neste doador no dia 56. (d) Um caso no qual a primeira amostra reativa já é representativa do estágio III (imunoenensaio enzimático (EIA) anti-HIV de 3º Geração reativo) com as amostras subsequentes progredindo para os estágios V e VI em 10 e 65 dias, respectivamente.

Tabela 1. Estadiamento laboratorial de infecção primária de infecção por HIV com base no surgimento de marcadores virais em 51 doadores de plasma com soroconversão.

Estágio RNA	Marcador					Duração em dias (95% IC) ^a	
	P24 Antígeno	Anticorpo (EIA)		Western blot	Individual	Cumulativo	
		NS	S				
I	+	-	-	-	-	5.0 (3.1, 8.1)	5.0 (3.1, 8.1)
II	+	+	-	-	-	5.3 (3.7, 7.7)	10.3 (7.1, 13.5)
III	+	+	-	+	-	3.2 (2.1, 4.8)	13.5 (10.0, 17.0)
IV	+	+/-	-	+	I	5.6 (3.8, 8.1)	19.1 (15.3, 22.9)
V	+	+/-	+/-	+	+ ^b	69.5 (39.7, 121.7)	88.6 (47.4, 129.8)
VI	+	+/-	+	+	+	Sem limite de duração	Sem limite de duração

^aOs cálculos se baseiam em um modelo paramétrico de Markov.

^bSem banda p31.

IC Intervalo de confiança; I, indeterminado; NS, não sensível, refere-se à imunoenensaio enzimático (EIA) não sensível à IgM, (2° Geração); S, sensível, refere-se à imunoenensaio enzimático (EIA) de 3° Geração.

Relação entre estágios do HIV e os níveis de HIV-1-RNA

Os níveis de HIV-1-RNA não são iguais nos seis estágios ($P < 0,001$, teste Kruskal-Wallis estratificado). A mediana dos níveis de HIV-1-RNA no estágio II tende a serem, em média, $2 \log_{10}$ mais elevada que os do estágio I (Fig. 2, e $P < 0,001$, teste Mann-Whitney estratificado). Em outras comparações sequencias pareadas através dos estágios apresentaram níveis de RNA equivalentes nos estágios II, III e IV, e decrescentes nos estágios V e VI (Fig. 3, e $P = 0,09$ estágio II versus III, $P = 0,05$ estágio III versus IV, $P < 0,001$ estágio IV versus V, e $P < 0,001$ estágio V versus VI).

Modelo de predição de HIV-1 RNA e razão S/CO do antígeno p24 no período pré-soroconversão

O HIV-RNA e a razão S/CO do antígeno p24 no grupo 'B' de painéis de doadores de plasma, representando a fase inicial de viremia, se elevaram concomitantemente por 13 dias desde primeira detecção de RNA (Fig. 4a, b). Conforme observado para os painéis de doadores 'A', a mediana dos níveis de HIV-1-RNA nas 85 amostras do estágio. II dos painéis 'B' foram, em média, $2 \log_{10}$ mais elevados que os das 60 amostras de doadores do estágio I ($P < 0,0001$, teste Mann-Whitney estratificado). No modelo de regressão linear, o coeficiente angular para HIV-RNA \log_{10} e a razão S/CO do antígeno p24 foram calculadas, obtendo o coeficiente angular de 0,35 e 0,23, respectivamente, sugerindo um aumento médio na carga viral de HIV de $0,35 \log_{10}$ (aumento de aproximadamente 2.2 vezes de HIV-RNA em cópias/mL) por dia, correspondendo ao 'tempo de duplicação' de HIV-RNA em cópias/mL de 20,5 h [Intervalo de Confiança 95% (IC) 18,2-23,4 h] durante este período de expansão dinâmica [11].

da Carga Viral. A correlação do HIV-RNA e os coeficientes lineares e angulares do antígeno p24 foram respectivamente de 0,94 e 0,82. A correlação de coeficiente angular de 0,82 entre indivíduos dá suporte ao pressuposto de um aumento simultâneo da HIV-1 RNA e a razão S/CO do antígeno p24 durante esta fase.

A partir do modelo de regressão mostrado na Fig. 4c, a estimativa pontual para a concentração de HIV-1-RNA na soroconversão do antígeno p24 é $4,01 \log_{10}$ (10.000) cópias/mL, com IC estimado de 95% de $3,31-4,97 \log_{10}$ (2.000-93 000 cópias/mL). A Fig. 4c também ilustra a derivação de intervalos de tempo relativa à soroconversão do antígeno p24 quando se espera que ensaios HIV-RNA possam detectar vírus em amostras diluídas (*pool*) e não diluídas.

Estimativa do encerramento da janela diagnóstica e eficácia dos ensaios de antígeno p24 e ensaios individuais e em mini pool de ácidos nucleicos

As reduções médias da janela imunológica para o teste do antígeno p24 (equivalente à duração do estágio II no presente estudo), assim como para o teste de mini pool e teste individuais de doadores de ácidos nucleicos, derivados dos cálculos do modelo aqui relatados são mostrados na Tabela 2 frente a um imunoenensaio enzimático (EIA) de anticorpos anti-HIV de 3° Geração com uma janela imunológica de 22 dias [3]. Estas projeções também assumem que os pacientes irão buscar atendimento, dentro dos estágios definidos, a uma taxa consistente com a duração de cada estágio, enquanto que em diferentes circunstâncias de triagem, a presença ou não de comportamento de risco recente ou de sintomas irá provavelmente influenciar a probabilidade de busca por atendimento

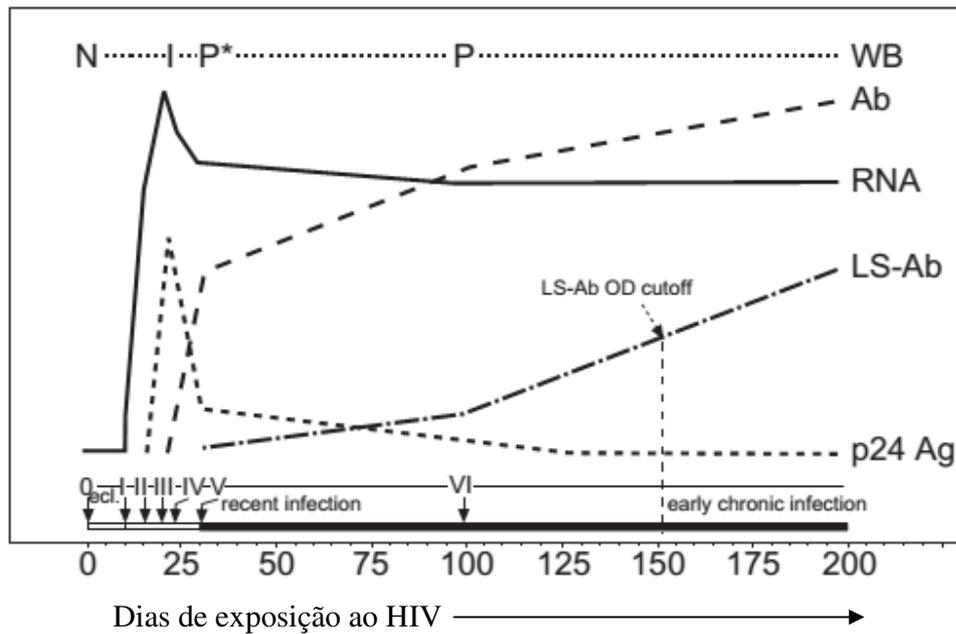


Fig. 2. Uma exposição esquemática semiquantitativa da progressão de marcadores de HIV. De cima para baixo: WB, Western blot, Ab, Anticorpo, anti-HIV, RNA, HIV RNA, LS-Ab. Anticorpo HIV determinado por estratégia de teste de imunoenensaio enzimático sensível/menos sensível [9], um ensaio não realizado neste estudo; p24 Ag, antígeno p24 do HIV, do momento da exposição (dia 0) até os 200 dias de infecção. Conforme cada um dos marcadores aparece na corrente sanguínea, é atribuído um novo estágio da infecção a partir de 0 (fase eclipse, ecl., caracterizado por marcadores virais não detectáveis em amostras de sangue; com relatos de que a duração, é em média, de até 11 dias a partir exposição viral [10]), passando pelo estágio I (viremia HIV RNA definitiva), estágio II (antigenemia p24), estágio III (imunoenensaio enzimático de anticorpos anti- HIV (EIA) reagente), estágio IV (Western blot indeterminado, 'I'), estágio V (Western blot positivo sem a banda p31, 'P ') e estágio VI (Western blot positivo, 'P' com a banda p31). Estágios I-VI foram derivados da análise do grupo 'A' de painéis de soroconversão de doadores de plasma como descrito aqui. Observe que a incorporação de teste EIA sensível/menos sensível (não realizado neste estudo) permitiria ainda a caracterização de amostras do estágio VI como representação de infecção recente versus infecção crônica inicial, i.e., infecção que ocorreu dentro do período de aproximadamente 6 meses a partir da soroconversão identificada por um imunoenensaio enzimático de 3^o Geração *versus* infecção que ocorreu além desse período [9]. O ponto de corte ("cutoff") da densidade ótica padronizada (OD) para os imunoenseaios enzimáticos (EIA) sensível/menos sensível pode ser alterado, com pontos de corte entre 0,5 a 1,0. Na figura são exibidos os resultados de um ponto de corte de densidade ótica de 0,75, conforme a publicação original [9]. Pontos de corte entre 0,5 e 1,0 resultariam em demarcações médias de infecções recentes para infecções crônicas iniciais em 124 e 186 dias, respectivamente.

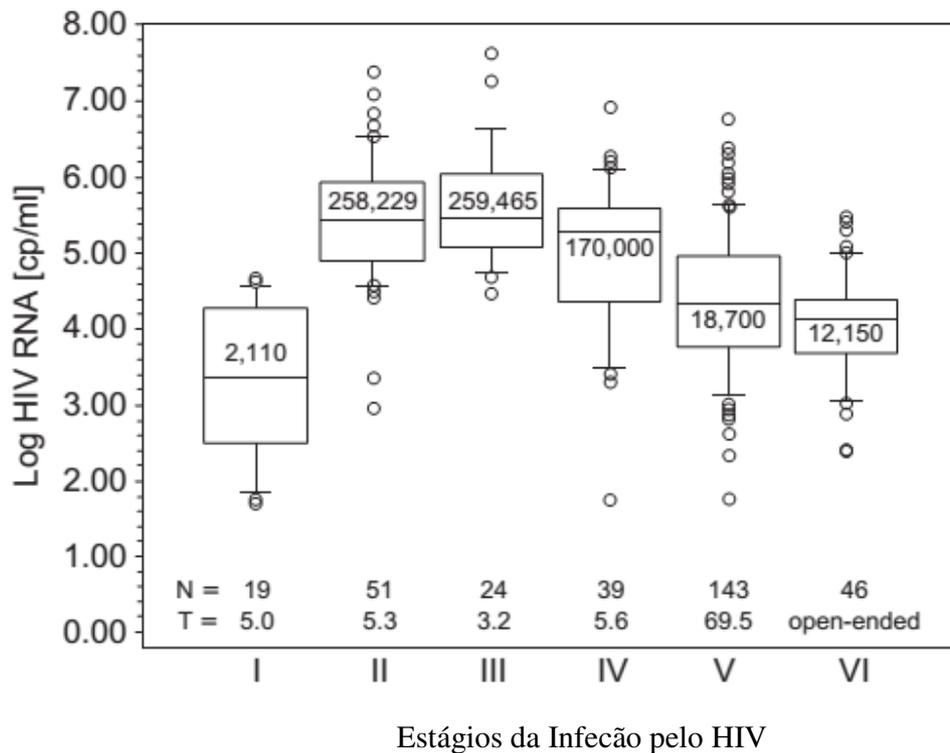


Fig. 3. Mediana de HIV-RNA log₁₀ (cópias/mL) (dentro das caixas), número de amostras analisadas e duração em dias (abaixo de cada caixa) para cada estágio de infecção pelo HIV como definido neste estudo. Os resultados para um total de 322 amostras são exibidos, representando 51 painéis de soroconversão obtidos a partir de doadores de plasma. As barras horizontais nas caixas representam medianas; os limites das caixas dos percentis de 75 e 25, e as barras dos percentis de 90 e 10, respectivamente. Os valores acima do percentil 90 e abaixo dos percentis 10 são representados como círculos. Observe que a mediana de HIV-RNA em cópias/mL no estágio II (reativa ao antígeno p24) excedem 100.000 (5 log₁₀) e que todas as amostras, com exceção de duas, possuem níveis de HIV-RNA maiores que 10.000 cópias/mL (4 log₁₀).

Discussão

Com base em nossa observação de que a reatividade do ensaio HIV-1 progrediu sequencialmente e de forma altamente consistente em doadores de plasma soroconversores, nós propomos um sistema de estadiamento laboratorial da infecção primária pelo HIV que inclui seis estágios, cada um definido por um padrão único de reatividade de ensaio (Fig. 2). Consistente com resultados prévios [16], encontramos picos de carga viral do HIV durante a soroconversão (estágio III), seguido de um declínio na direção de um estado aparente de platô coincidindo com a maturação do Western blot (estágios V VI; Fig. 2). Em nenhum de nossos casos os níveis de HIV-RNA se tornaram indetectáveis durante o estágio VI, embora isto tenha sido reportado em alguns casos quando a metodologia padrão de HIV-RNA for utilizada [17]. Nestes casos, o HIV RNA foi detectável utilizando métodos ultrasensíveis [17]. O antígeno p24 do HIV-1 foi detectado em todas as amostras durante os estágios II e III, mas foi desaparecendo subsequentemente de maneira gradual, consistente com a formação do complexo imune entre o antígeno e os emergentes anticorpos anti-HIV [3, 18,19]. A presença de bandas

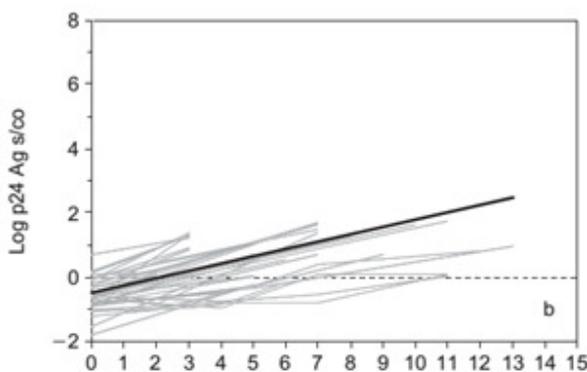
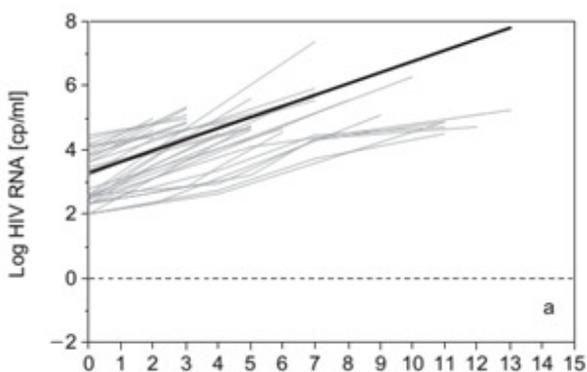
de Western blot que definem a infecção por HIV, mas com a ausência de reatividade da banda p31 (estágio V), foi indicador de soroconversão dentro dos 2-3 meses anteriores, um achado confirmado em um estudo recente de 98 indivíduos recém-infectados identificados na rede do Programa de Pesquisa de Infecção Aguda e Doença Precoce [20].

Ao oferecer estimativas para períodos de janela diagnóstica associados aos ensaios virais em sua metodologia padrão para HIV-1, nos quais o período de janela é definido como período de tempo entre a infectividade e a detectabilidade de infecção pelos ensaios, o sistema de estadiamento proposto tem aplicação direta nos propósitos de triagem de doador de sangue e na prevenção da propagação de HIV em outros cenários. Com base em uma janela imunológica pressuposta de 22 dias para a detecção de anticorpos de HIV por imunoenensaio enzimático (EIA) de 3° Geração, e aproximadamente 5 dias para cada um dos dois estágios de pré-soroconversão caracterizados neste estudo, obtivemos as estimativas dos períodos de janela potencialmente infecciosos para o antígeno p24 e HIV RNA de, aproximadamente, 17 a 12 dias respectivamente. Estas

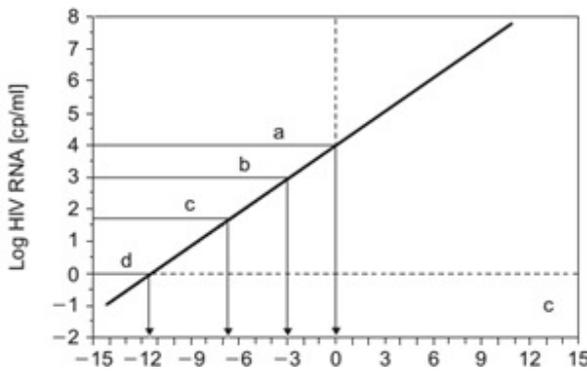
estimativas podem, então, ser combinadas com os dados da taxa de incidência para estimar os riscos da transfusão das unidades na janela diagnóstica no contexto de diferentes cenários de triagem de doador [21,22].

Como a extensão da janela imunológica depende da sensibilidade do ensaio, nossa estimativa de período da janela de 5 dias para a detecção de HIV-RNA reflete a sensibilidade um pouco menor de um ensaio de PCR transcriptase reversa de geração anterior. Para poder estimar as durações da janela imunológica para testes mais recentes de HIV-RNA ultrasensíveis, desenvolvemos uma abordagem para relacionar o número de cópias de HIV-RNA durante a fase dinâmica da expansão viral inicial para a evolução da reatividade do antígeno p24 ao longo do tempo. Utilizando um modelo de regressão linear de medidas

repetidas bivariadas e análise de regressão linear, pudemos, então, estimar o número médio de cópias HIV-RNA no momento da soroconversão do antígeno p24, e estimar os níveis de HIV-RNA em momentos anteriores em relação à detectabilidade do marcador p24. O modelo prevê um nível médio de HIV-RNA de 10.000 cópias/mL (95%IC 2.000-93.000 cópias/ml) quando o antígeno p24 se torna detectável, e um aumento de 0,35 log₁₀ HIV RNA por dia. Considerando que os ensaios HIV-RNA apresentam diferentes limites de detecção, projetamos que um ensaio com sensibilidade de 50 cópias/mL detecta HIV aproximadamente 7 dias antes que o teste do antígeno p24, e que o limite de detecção teórica de 1 cópia/mL HIV seria alcançado, aproximadamente, 11 dias mais cedo.



Número de dias desde a primeira amostra de HIV RNA



Número de dias desde a soroconversão do antígeno

Fig. 4. (a) Carga viral de HIV (\log_{10} cópias/mL) em 97 amostras obtidas a partir de 44 doadores de plasma soroconvertidos em função de tempo a partir das primeiras amostras com HIV-RNA positivo (dia 0). Os valores de HIV-RNA refletem a fase inicial de aumento da viremia (ver Métodos). Os valores seriados de um mesmo doador estão conectados por linhas retas na cor cinza. As linhas sólidas na cor preta representam os valores de RNA que correspondem ao coeficiente linear e coeficiente angular médios decorrentes de modelos matemáticos de valor de RNA individuais. (b) A razão S/CO do antígeno p24 em \log_{10} para as mesmas amostras em (a). As linhas sólidas na cor preta representam os valores do antígeno p24 (Ag) que correspondem a coeficiente linear e coeficiente angular médios obtidos a partir de modelo matemático de valores individuais de antígeno p24. (c) O cálculo de intervalos de tempo. Para um dado coeficiente linear e angular (aqui a mediana do coeficiente linear e angular são usados), o tempo de soroconversão do antígeno p24 [relação S/CO de antígeno p24 $\log_{10} = 0$] pode ser determinado e estabelecido como tempo 0. Então, os momentos em que HIV-RNA \log_{10} cópias/mL é igual aos valores do ponto de referência podem ser determinados com relação ao tempo de soroconversão do antígeno p24. As linhas a-d e setas indicam os dias em relação a soroconversão do antígeno p24 quando HIV-RNA \log_{10} cópias/mL são 4 (10.000), 3 (1.000), 1,7 (50) e 0 (1), correspondendo aos limites de detecção para teste de antígeno p24, teste de ácido nucleico mini-pool, teste de ácido nucleico individual e um ensaio de teste de ácido nucleico teórico com máxima sensibilidade, respectivamente. Consequentemente, espera-se que o teste de ácido nucleico em mini-pool detecte HIV em média 3 dias antes que o teste do antígeno p24, e teste de ácido nucleico individual detectaria o vírus 7 dias mais cedo. Espera-se que um ensaio de teste de ácido nucleico teórico, capaz de detectar de maneira confiável 1 cópia/mL HIV, torne-se reativo aproximadamente 11 dias mais cedo que o teste de antígeno p24.

Tabela 2. Eficácia estimada dos ensaios de antígeno p24 e RNA em comparação ao imunoensaio enzimático na identificação de infecções agudas pelo HIV.

Ensaio	Nível presumido de detecção por HIV RNA (cópias/mL)	Estimativa da redução da janela diagnóstica (em dias) em relação ao imunoensaio (EIA) de 3° Geração	Estimativa do número de infecções pelo HIV diagnosticadas durante o período de janela diagnóstica a cada 1.000 indivíduos em diferentes cenários de testagem. ^a		
			Doadores de sangue (TI $\frac{1}{4}$ 1.6/10 ⁵ p.a.)	Clínica de DST (TI $\frac{1}{4}$ 100/10 ⁵ p.a.)	Clínica/Serviço de Alto Risco (TI $\frac{1}{4}$ 10 000/10 ⁵ p.a.)
Antígeno p24	10000	5	0.00022	0.014	1.4
RNA em Minipool	1000	8	0.00035 ^b	0.022 ^c	2.2 ^c
RNA Individual	50	12	0.00053	0.033	3.3

São mostradas as reduções estimadas na janela diagnóstica e eficácia na identificação de infecções na janela diagnóstica pelos ensaios de antígeno p24, ensaios mini-pool com 20 membros e de HIV-RNA individual (não diluído) em relação a um imunoensaio enzimático (EIA) de 3° Geração (janela diagnóstica de 22 dias). O término do período de janela diagnóstica para o antígeno p24 em relação a um imunoensaio enzimático baseou-se em uma duração média de 5 dias a partir da reatividade do antígeno p24 para o imunoensaio enzimático (EIA) de 3° Geração no presente estudo; outras reduções para mini-pool e RNA individual baseiam-se em cálculos de modelos aqui relatados. A Taxa de Incidência (TI) representativa de infecção pelo HIV em doadores de sangue baseia-se nos dados da Cruz Vermelha Americana para o período de 2000-2001 [12]. A TI em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (DST) (0,1%) reflete a TI entre heterossexuais em uma extensa pesquisa de áreas metropolitanas nos EUA [13]. A TI para uma hipotética 'clínica de alto risco' foi definido como 100 vezes mais elevada com base na TI em certas clínicas em San Francisco que excederam a TI em 15 vezes ao de uma clínica padrão [9].

^a A Taxa de Incidência (TI) representativa por 100 000 pessoas-ano (p.a.) é dada para cada cenário de testagem.

^b A eficácia observada em 19.811.809 doações de triagem de 1999 a 2002 foi igual a 0,00025 por 1000 [12].

^c A eficácia observada em 8.505 amostras de indivíduos consecutivos encaminhados para testagem e aconselhamento de HIV durante um período de 20 dias úteis em 2001 em 110 locais de testagem públicos na Carolina do Norte foi igual a 0,49 por 1000 [15]. As amostras neste estudo foram testadas em pools com um ensaio de HIV-RNA com sensibilidade efetiva de 1800 cópias/mL. A TI na população testada não foi informada, mas espera-se que tenha ficado entre 100-10.000/10⁵ pessoas-ano, por exemplo, a TI que pressupomos para a clínica padrão e a hipotética 'clínica de alto risco', respectivamente.

Nosso modelo também permite projeções de período da janela para testar amostras em pool com testes HIV-RNA, como é feito atualmente na triagem de doadores de sangue nos EUA [23]. Nesta situação, os vírus presentes em uma amostra seriam diluídos no pool, reduzindo a sensibilidade aparente do ensaio. Se o grupo contém 20 amostras, como na média da utilização da estratégia chamada 'mini-pool' empregada na triagem de doador de sangue, um ensaio de HIV-RNA com um limite de

detecção de 50 cópias/mL indicaria um limite de detecção de 1000 cópias/mL por causa da diluição de 20 vezes do vírus no pool. Neste cenário, o modelo preveria a detectabilidade do HIV pelo ensaio RNA, aproximadamente, 4 dias mais tarde do que se a amostra tivesse sido testada não diluída, ou 3 ao invés de 7 dias antes da reatividade do antígeno p24 em uma amostra não diluída. Dois casos recentes de transmissão de HIV por doações que apresentaram resultados não reativos em

teste em *pool*, porém reativo em teste de amostras não diluídas, confirmam que estas doações são infecciosas [24,25]. Nossa análise permite estimar a frequência de tais doações com base em taxas de incidência conhecidas em doadores, para uso em políticas de deliberações, considerando o valor da implementação de testes individuais de RNA em triagem de doadores de sangue. Projeções similares podem ser utilizadas para estimar os benefícios da testagem utilizando RNA ou antígeno p24 em outras situações, como clínicas de doenças sexualmente transmissíveis ou populações que participam de ensaios clínicos com vacinas (Tabela 2).

Por fim, acreditamos que o sistema de estadiamento proposto tem aplicação na prática clínica, embora várias ressalvas precisem ser consideradas. Primeiro, nosso sistema de estadiamento baseia-se no uso de um imunoensaio enzimático (EIA) de 3ª Geração para a detecção da soroconversão; pode-se esperar reatividade tardia quando um imunoensaio enzimático (EIA) menos sensível é utilizado, conforme observamos neste estudo. Segundo, a curta duração dos estágios I-IV parece limitar o uso do estadiamento na maioria das circunstâncias na prática, pois os pacientes geralmente buscam atendimento após a soroconversão. Por fim, nossas observações em doadores de plasma talvez não sejam aplicáveis a pacientes recém-infectados em geral. Em particular, pacientes que apresentam uma síndrome retroviral altamente sintomática podem apresentar níveis mais elevados de viremia e soroconversão tardia, quando comparados com doadores de plasma que continuaram a se apresentar para doação, e, portanto, como um grupo, pode representar indivíduos infectados sem sintomas ou com sintomas agudos mais leves. Com estas restrições em mente, o estadiamento proposto oferece um quadro de referência para quando esperar que marcadores virais se tornem positivos na infecção primária pelo HIV, o que poderia auxiliar na solução de situações de diagnóstico difícil ou incomum. Além disso, a abordagem de estadiamento oferece uma nova base para a estratificação de pacientes inscritos em ensaios clínicos. Definir o estadiamento laboratorial na fase inicial do diagnóstico e o início da intervenção terapêutica podem ajudar a responder inúmeras questões importantes: (i) A antecipação do início do tratamento durante os estágios de pré-soroconversão virêmica pode abortar a infecção? (ii) Caso negativo, o início precoce da terapia antirretroviral altamente ativa e sua manutenção ou os protocolos de interrupção de tratamento supervisionado [14,26] podem resultar em redução de níveis em longo prazo do *setpoint* viral com benefício clínico sustentado? (iii) O momento do início da terapia (i.e., o estágio) influencia a resposta ao tratamento precoce?. Ensaios clínicos terapêuticos, utilizando o sistema de estadiamento laboratorial de infecção pelo HIV descritos neste relatório estão atualmente em andamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem Barbara Johnson pelo auxílio com sua experiência na preparação do manuscrito.

Patrocínio: Este trabalho foi patrocinado pelos subsídios dos National Institutes of Health NO1-HB-47114 e UO1 AI-41531, e pelo acordo cooperativo do Centers for Disease Control and Prevention U64-CCU-902948.

Referências

1. Mylonakis E, Paliou M, Lally M, Flanagan TP, Rich JD. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am J Med* 2000, 109: 568–576.
2. Nguyen KA, Busch MP. Evolving strategies for diagnosing human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 2000, 109:595–597.
3. Busch MP, Satten GA. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am J Med* 1997; 102:117–124; discussion 125–116.
4. Hecht FM, Busch MP, Rawal B, Webb M, Rosenberg E, Swanson M, et al. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 2002, 16: 1119–1129.
5. Efron B, Tibshirani R. An introduction to the bootstrap. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC; 1998.
6. Satten GA, Sternberg MR. Fitting semi-Markov models to interval-censored data with unknown initiation times. *Biometrics* 1999, 55:507–513.
7. Satten GA. Estimating the extent of tracking in interval-censored chain-of-events data. *Biometrics* 1999, 55:1228–1231.
8. Searle SR, Casella G, McCulloch CE. Variance components. New York: Wiley and Sons; 1992.
9. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 1998, 280:42–48.
10. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998, 339:33–39.
11. Schreiber GB, Glynn SA, Satten GA, Kong F, Wright D, Busch MP, et al. HIV seroconverting donors delay their return: screen- ing test implications. *Transfusion* 2002, 42:414–421.
12. Dodd RY, IV, Notari EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window- period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002, 42:975–979.
13. Holmberg SD. The estimated prevalence and incidence of HIV in 96 large US metropolitan areas. *Am J Public Health* 1996, 86:642–654.
14. Lori F, Lisziewicz J. Structured treatment interruptions for the management of HIV infection. *JAMA* 2001, 286:2981–2987.
15. Pilcher CD, McPherson JT, Leone PA, Smurzynski M, Owen- O'Dowd J, Peace-Brewer AL, et al. Real-time, universal screening for acute HIV infection in a routine HIV counseling and testing population. *JAMA* 2002, 288:216–221.
16. Lindback S, Karlsson AC, Mittler J, Blaxhult A, Carlsson M, Briheim G, et al. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. Karolinska Institutet Primary HIV Infection Study Group. *AIDS* 2000, 14:2283–2291.
17. Garrett PE, MacKeen VL, Schumacher RT. Routine HIV RNA assays should not replace anti-HIV-1 Western Blot to confirm HIV infection. *Transfusion* 2002, 42 (Suppl.):4S.
18. Cabezas T, Quiros E, Garcia F, Hernandez-Quero J, Bernal MC, Martinez MA, et al. Immune complex p24 antigen: a new prognostic marker in human immunodeficiency virus infection. *Infection* 1994, 22:4–7.
19. Cao YZ, Valentine F, Hojvat S, Allain JP, Rubinstein P, Mirabile M, et al. Detection of HIV antigen and specific antibodies to HIV core and envelope proteins in sera of patients with HIV infection. *Blood* 1987, 70:575–578.
20. Hecht FM, Holte S, Busch MP, Hogan C, Little S, Schacker T, et al. Absence of p31 band identifies persons with recent HIV seroconversion. Abstract presented at XIVth International AIDS Conference. Barcelona, Spain, 7–12 July 2002 [Abstract TuPeC488].
21. Busch M. Closing the windows on viral transmission by blood transfusion. In: Stramer S, editor. Blood safety in the new millennium. Bethesda, MD: AABB; 2000. pp. 33-54.
22. Glynn SA, Kleinman SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the incidence rate/window period model. *Trans-*

- fusion 2002, 42:966-972.
23. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000, 40:143-159.
 24. Ling AE, Robbins KE, Brown TM, Dunmire V, Thoe SY, Wong SY, et al. Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with preseroconversion blood components during the infectious window period. *JAMA* 2000, 284:210-214.
 25. Delwart E, Kalmin N, Jones S, Ladd D, Tobler L, Tsui R, Busch M. First case of HIV transmission by an RNA-screened blood donation. Presented at the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle WA, 24-28 February 2002 [Abstract 768-W (Poster) www.retroconference.org/2002/]
 26. Altfield M, Walker BD. Less is more? STI in acute and chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 2001, 7:881-884.