

Synara Alexandre Araujo Silva

**Desenvolvimento de uma técnica molecular
para detecção e quantificação do vírus da
hepatite G (GBV-C/HGV)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Synara Alexandre Araujo

Desenvolvimento de uma técnica molecular para detecção e quantificação do vírus da hepatite G (GBV-C/HGV) / Synara Alexandre Araujo Silva. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Vírus GB C 2.HIV 3.Hepatite 4.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/SBD-057/10

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
DEPARTAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

Chefe do Laboratório: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti
Coordenador do Curso de Pós –Graduação: Prof. Dr. Alúísio Segurado

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – projeto de número 2005/01072-9.

DEDICATÓRIA

*A DEUS e a Mãe Rainha, por me iluminarem todos os dias;
aos meus pais Valter (in memória) e Eliete, pelo amor e apoio incondicional;
e aos meus irmãos Nayra e Valter Jr., por acreditarem em mim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Mãe Rainha, por me mostrarem que não há escuridão onde a luz da fé não possa chegar.

Ao meu orientador Dr. José Eduardo Levi “Dudi”, pela oportunidade deste trabalho, pelos ensinamentos, incentivos e mais que tudo pelo apoio e compreensão em um dos momentos mais difíceis de minha vida. Obrigada!!

Aos meus pais Valter Alexandre (*in memória*) e Maria Eliete, fonte de minha força e coragem e aos meus irmãos Nayra Lygia e Valter Jr. e sobrinhos Vinícius e Yasmin pelo apoio e amor sempre presente. Agradeço pelo orgulho que sentem de mim.

Ao Dr. Cláudio Pannuti e a Dra. Clarisse Machado, por me abrirem as portas do laboratório de Virologia com a oportunidade de estágio que me foi dada ao chegar em São Paulo.

Aos meus tios Miguel, Ednalva e Marcos Edilson, por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando, acreditando que eu conseguiria.

A todos os meus familiares que estiveram sempre ao meu lado, por meio de palavras, pensamentos e orações.

A Lucy, por ter sido um anjo na terra, que por muitas vezes estendeu a mão para mim. Com seu carinho, apoio, compreensão e amizade.

Aos amigos Renato, José de Paula, Adriana Machado, Cristina Fink, Laura Sumita, Marli, Carolina Bernal, Cíntia Canto, Michela Gabriele e Alessandra Machado pelo convívio e amizade fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

As amigas Cynthia Cristina, Célia Rodrigues, Carolina Mamana e Jaila Borges, pelo carinho especial, amizade e apoio na construção e finalização deste projeto. Obrigada!! Vocês foram fundamentais para mim.

As secretárias da Pós-graduação Roseli e Vânia, pelo apoio, carinho e alegria dedicados a mim.

A todos os colegas que fazem parte do Instituto de Medicina Tropical da USP, por de alguma forma participarem da minha jornada em São Paulo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Vírus da Hepatite G ou GBV-C	14
1.2. Reação de PCR em tempo real	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Amostras	27
4.2. Determinação qualitativa de anticorpos anti-E2 GBV-C	28
4.2.1. Teste confirmatório para detecção do anticorpo específico anti-E2	28
4.3. Extração de RNA	29
4.4. Reação de Transcrição Reversa	29
4.5. Reação de PCR GBV-C Convencional	31
4.6. Reação de NESTED PCR GBV-C	32
4.7. Validação da PCR em tempo real para GBV-C	33
4.7.1. Definição do ensaio e dos primers	34
4.7.2. Calibração do ensaio e curva – padrão	35
4.7.3. Teste de avaliação da interferência de outros vírus na reação de PCR em tempo real para GBV-C.	36
5. RESULTADOS	38
5.1. Sorologia	38
5.2. PCR GBV-C convencional	38
5.3. Nested PCR GBV-C	39
5.4. PCR em Tempo Real para GBV-C	40
5.4.1. Calibração do ensaio e curva padrão	40
5.4.2. Avaliação de interferência	43
5.4.3. Amostras	43
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Pacientes do estudo divididas por faixa etária	27
Tabela 2. Reagentes, volumes e concentrações utilizados na primeira etapa da reação de transcrição reversa (mix I)	30
Tabela 3. Reagentes, volumes e concentrações utilizados na segunda etapa da reação de transcrição reversa (mix II)	30
Tabela 4. Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação de PCR GBV-C convencional	31
Tabela 5. Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação de NESTED PCR GBV-C	33
Tabela 6. Reagentes, volumes e concentrações utilizados no PCR em tempo real	35
Tabela 7. Resultados de Carga Viral de GBV-C (N=57) e contagem de CD4 e Carga Viral de HIV	43
Tabela 8. Resultados finais dos testes laboratoriais para GBV-C. α = anti-HGVenv; RNA = Viremia GBV-C	45
Tabela 9. Comparação dos resultados laboratoriais sorológicos e moleculares, técnica por técnica. Sorologia = anti-E2	45
Tabela 10. Média, Mediana e Desvio-Padrão dos valores de Carga Viral HIV e Contagem de Células CD4 nos grupos GBV-C-RNA positivo e negativo	45

Lista de Figuras

Figura 1. Fotografia de gel de agarose referente à PCR GBV-C convencional	39
Figura 2. Fotografia de gel de agarose referente à reação de Nested PCR GBV-C	40
Figura 3. Relatório do PCR em tempo real de corrida da amostra padrão	41
Figura 4. Gráfico de amplificação correspondente ao relatório da Fig.3	41
Figura 5. Curva de Calibração do PCR em Tempo Real GBV – C	42
Figura 6. Relatório de uma reação de PCR em tempo real com amostras do estudo	42

Lista de Abreviações

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Humana
Anti- E2 - Anticorpos contra a proteína E2 do envelope do HGV/GBV-C
CCR5 - Co-receptor celular da infecção pelo HIV
CD4 - Marcador de superfície celular de células T auxiliares
cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar
Ct - Cycle Treshold
CXCR4 - Co-receptor celular da infecção pelo HIV
Elisa - Ensaio Imunoenzimático
EUA - Estados Unidos da América
FDA - Agência Americana para administração de drogas e alimentos
GBV-A - Vírus GB-A
GBV-B - Vírus GB-B
GBV-C - Vírus GB-C
HBV - Vírus da Hepatite B
HCV - Vírus da Hepatite C
HGV - Vírus da Hepatite G
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
NCR - Região não codificante
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PDN - Primers randômicos
RANTES - Reguladores naturais da expressão de receptores das células T
RNA - Ácido Ribonucléico
UTR – Região não traduzida

RESUMO

Introdução: O vírus da hepatite G (GBV-C/HGV) é um flavivírus de genoma RNA de fita simples polaridade positiva, replicando em linfócitos, não sendo até hoje associado a qualquer patogenia humana. Estudos recentes demonstram que pessoas co-infectadas pelos vírus GBV-C/HGV e HIV têm menor progressão para AIDS e morte, embora alguns estudos tenham falhado em demonstrar tais efeitos.

Objetivo: Determinar a soroprevalência e viremia (qualitativa) por GBV-C/HGV nas amostras de pacientes HIV+ e desenvolver uma metodologia de PCR em tempo real para fazer a determinação das cargas virais de GBV-C/HGV.

Métodos: Avaliamos a presença de anticorpo e RNA do vírus GBV-C/HGV em 253 amostras de plasma de mulheres HIV positivas, coletadas entre 1997-99. Realizamos o ensaio imunoenzimático anti-E2 (EIA anti-HGenv kit, Roche™), a reação em cadeia da polimerase (PCR), o NESTED PCR e, padronizamos um PCR em tempo real (RT-PCR), ensaio baseado no sistema Taqman, também aplicado nas mesmas amostras. A curva-padrão do ensaio foi feita com diluições seriadas de uma bolsa de plasma GBV-C/HGV+, e os resultados expressos em unidades aleatórias/mL.

Resultados: Das 253 amostras testadas, 64 foram positivas para o anticorpo anti-E2 (25,3%), 36 RNA positivas no PCR convencional (14,2%) e, no NESTED PCR e PCR em tempo real 57 amostras foram concordantemente RNA positivas (22,5%), perfazendo um índice total de exposição de 48% (25.3 + 22.5). A carga viral teve uma média de 1.396 UA/mL (13.625 - 1.1UA/mL). As cargas virais encontradas não tiveram correlação direta com parâmetros laboratoriais da infecção pelo HIV como a carga viral e a contagem de células CD4.

Conclusões: Foi obtida uma metodologia simples, rápida e de boa sensibilidade e especificidade, permitindo a quantificação do RNA do vírus GBV-C com reprodutibilidade. A metodologia permite análise simultânea de um grande número de amostras, sendo apropriada para estudos clínicos. A prevalência de exposição á este agente na população feminina HIV+ estudada é alta, provavelmente decorrente da via sexual comum de transmissão dos agentes.

SUMMARY

Introduction: The Hepatitis G (GBV-C / HGV) agent is a flavivirus. Its genome is composed of single stranded RNA of positive polarity, replicating in lymphocytes. Up to now, it hasn't been implicated in any disease associated to human beings. Recent studies demonstrate that persons co-infected by the viruses GBV-C / HGV and HIV have a slower rate of progression to AIDS and death, although some studies have failed in demonstrating such effects.

Objective: To determine the seroprevalence and viremia (qualitative) of GBV-C / HGV in samples from HIV-infected women. To develop a methodology of Real-Time PCR for GBV-C / HGV viral load determination.

Methods: The presence of antibody and GBV-C/HGV RNA was evaluated in 253 plasma samples from HIV infected women, collected between 1997-99. An immunoenzymatic assay (EIA kit for anti-E2, Roche™) was applied to obtain the seroprevalence while the polymerase chain reaction (PCR), nested PCR, and a standardized Taqman based real-time PCR (RT-PCR), were used in the assessment of viral RNA. For the viral load, a standard-curve was made with serial dilutions of a plasma bag containing GBV-C/ HGV RNA+, and results were expressed in random units/mL, in comparison to the reference material.

Results: Of the 253 samples tested, 64 were positive for anti-E2 (25.3%), 36 RNA positive by PCR (14.2%), and 57 (22.5%) where both nested PCR and real-time PCR RNA positive, for a total exposure index of 48%. The mean viral load was of 1.396 RU/mL (13.625 - 1.1 RU/mL). GBV-C/HGV Viremia was not correlated to HIV laboratorial parameters, i.e. CD4 and HIV-RNA counts.

Conclusions: A simple, fast and efficient system for the determination of GBV-C/HGV viral load was developed, presenting appropriate sensitivity and specificity, allowing reproducible quantification of GBV-C RNA in stored plasma samples. The methodology allows simultaneous analysis of a large number of samples, being appropriate for clinical studies. The prevalence of exposition to this agent in the studied female population is high, probably a consequence of the common sexual way of transmission of the agents.

1. Introdução

1.1 – Vírus da Hepatite G ou GBV-C

Ao estudar agentes causadores de hepatites virais em 1967, Deinhardt e colaboradores¹, realizaram um experimento com o soro de um paciente de 34 anos, (cujas iniciais eram G.B.), que apresentava há três dias um quadro de hepatite aguda. O soro do paciente foi inoculado em sagüis, estes tiveram seus soros testados e apresentaram alterações na função hepática. Foram realizadas inoculações seriadas em outros sagüis, que também apresentaram o desenvolvimento da doença. O vírus então foi nomeado de agente GB, em homenagem ao paciente do qual foi retirado. Estudos seguintes demonstraram que o vírus GB era transmitido pela via parenteral entre os sagüis e não estava relacionado sorologicamente com outros vírus causadores de hepatite².

Em 1995, Simmons e colaboradores³, inocularam novamente alguns sagüis, com amostras originadas de um pool de soro dos sagüis que apresentaram o agente GB, esses novos primatas também desenvolveram hepatite. Esses animais tiveram seus soros analisados e foram encontrados dois vírus chamados de GBV-A e GBV-B. Em seqüência, Simmons⁴ realizou um novo estudo em humanos, com duas populações consideradas de alto risco para exposição aos vírus de hepatites, identificando um novo vírus que foi chamado de GBV-C, por apresentar grande semelhança das suas seqüências genômicas com os vírus GBV-A e GBV-B. O GBV-C foi implicado como agente causador de hepatite humana de etiologia desconhecida por ser encontrado em pacientes que apresentavam um quadro clínico de hepatite, porém sem a evidência de infecção dos vírus das hepatites A,B,C,D ou E.

Simultaneamente, outro estudo era realizado por um grupo que trabalhava com hepatites, coordenado por Linnen⁵, identificando em 1996, um novo vírus causador da hepatite não-A -E em pacientes com hepatite crônica, que foi chamado vírus da hepatite G ou HGV. Com a publicação da seqüência genômica completa do HGV e sua análise filogenética⁶⁻⁹, foi possível comparar e constatar que o GBV-C e o HGV possuíam 96% de homologia entre seus genomas, indicando que de fato, tratava-se de dois isolados do mesmo vírus⁵. Desde então, ambas as nomenclaturas (GBV-C/ HGV) são usadas na literatura.

O GBV-C/HGV é um Flavivírus, que possui um genoma RNA de fita simples com polaridade positiva composto aproximadamente por 9.400 nucleotídeos ¹⁰, contendo apenas um longo ORF (“open reading frame”) codificando uma grande poliproteína viral que é clivada por peptidases virais e do hospedeiro, dando origem às proteínas estruturais: duas proteínas do envelope viral, E1 e E2 e as proteínas não estruturais: uma RNA helicase, uma serina protease, e uma RNA polimerase RNA-dependente ^{4,5}.

O GBV-C/HGV faz parte de um grupo da família *Flaviviridae* que é capaz de infectar humanos, dentre eles estão o vírus da dengue, o vírus da encefalite japonesa, o vírus da febre amarela e o vírus do Oeste do Nilo ¹⁴, além de apresentar uma homologia genômica de 25% com o vírus da Hepatite C ¹⁵. Embora haja esta homologia, há também muitas diferenças, entre elas estão as proteínas estruturais do GBV-C/HGV e do HCV, o que faz com que o GBV-C/HGV seja muito menos variável e como esta característica está ligada diretamente no escape do sistema imune e persistência viral, ao contrário do HCV, que produz cerca de 75% de infecção crônica, o GBV-C/HGV persiste em 25% dos infectados ¹⁶.

A segunda diferença entre estes vírus é a falta de uma região codificadora de proteína do nucleocapsídeo em muitos isolados do GBV-C/HGV, o que poderia sugerir que este seria um vírus envelopado sem nucleocapsídeo. Entretanto, estudos realizados por microscopia eletrônica e análises biofísicas, mostraram posteriormente que GBV-C/HGV tem um nucleocapsídeo, porém a composição exata desta estrutura ainda não foi elucidada ¹⁷.

Comprovadamente, o GBV-C/HGV é um vírus linfotrópico, que replica nas células mononucleares do sangue periférico, medula óssea e baço, tendo como menos importante a replicação hepática ¹⁸. Doravante, a partir deste momento utilizaremos apenas a nomenclatura vírus GB-C (GBV-C) como indicado pela literatura.

A análise filogenética de seqüências genômicas do GBV-C isoladas de amostras de todo o mundo, revelaram a existência de cinco genótipos, que estão estreitamente relacionados com a região geográfica, sugerindo que o GBV-C é um vírus antigo, que acompanhou as migrações populacionais ao longo da história ^{19,20}. Há um predomínio do

genótipo 1 na África Ocidental, do genótipo 2 na Europa e EUA, do genótipo 3 na Ásia, do genótipo 4 no Sudeste Asiático e do genótipo 5 na África do Sul ²¹. No Brasil, há um predomínio dos genótipos 2 com cerca de 80 a 92% das infecções e 1 com aproximadamente 8 a 20% ^{22,23}.

No ensaio imunoenzimático, utilizado para identificar se o indivíduo já foi exposto ao vírus GBV-C, é o anticorpo contra a glicoproteína E2 do envelope que é detectado. Por ser o anti-E2 um anticorpo neutralizante, raramente se encontra um indivíduo que apresente a viremia após desenvolver o anticorpo anti-E2 ¹⁰. A ocorrência deste fato é de menos de 1% dos casos ¹¹⁻¹³. A infecção pelo GBV-C é definida pela detecção do RNA do vírus no soro ou plasma. Essa detecção é feita pela técnica de amplificação do ácido nucléico viral, utilizando métodos como PCR, nested - PCR ou Real Time – PCR. ²⁴⁻²⁸

Estudos epidemiológicos indicam que o GBV-C é encontrado mundialmente em populações sadias com uma prevalência alta, apesar de ser constatado que as populações que foram expostas a sangue e derivados apresentem uma prevalência ainda maior ²⁴. A taxa de exposição da população sadia (doadores de sangue) ao GBV-C na Europa e na América do Norte é de aproximadamente 1 a 4%, já na América do Sul, África e Ásia esta prevalência é aumentada, se apresentando entre 8 a 15% ^{25,26}. Estes dados indicam que doadores de sangue apresentarão 5 a 10 vezes mais viremia pelo GBV-C que pelo HCV. No grupo que apresentou exposição ao sangue e derivados, a prevalência de positividade para o anticorpo anti E2 foi de até 70% ¹¹.

A transmissão do GBV-C pela via sexual, parece ser muito eficiente, pois um estudo realizado verificou que a taxa global de infecção pelo GBV-C é semelhante entre pessoas HIV positivas que adquiriram o HIV pela via parenteral e as que adquiriram pela via sexual ²⁷. Um estudo realizado por Thomas e colaboradores ¹¹ verificou que cerca de 30 a 40% dos homens HIV positivos que foram infectados pela via sexual, eram também positivos para GBV-C e que 40 a 50% destes homens HIV positivos apresentavam o anticorpo anti E2 em seus soros. Já a transmissão materno- infantil ocorre em até 89% dos casos, entretanto novos estudos precisam ser realizados para determinar com clareza as taxas de persistências e cura espontânea em crianças infectadas verticalmente ²⁵.

No Brasil, uma pesquisa conduzida por Bassit e colaboradores²⁸, em 1998, avaliou a prevalência da viremia pelo GBV-C entre 200 doadores de sangue e relatou uma taxa de 9%. Já em 2002, um grupo de São Paulo²⁹ avaliou a viremia em 1039 amostras de indivíduos sadios maiores de 2 anos e relatou uma prevalência de 5,1%; outro trabalho do mesmo ano, de Oliveira e colaboradores²², avaliou 241 doadores da região central do Brasil e relatou uma frequência de viremia de 7,1%. Em 2003, Levi e colaboradores³⁰, reportaram que entre 545 doadores de sangue da cidade de São Paulo havia uma prevalência de 9,7% de positividade para o GBV-C RNA. Com base nos dados acima, observamos que a prevalência de viremia pelo GBV-C entre doadores de sangue voluntários no Brasil está situada entre 5 a 10%.

A maioria dos indivíduos infectados pelo GBV-C desenvolve uma infecção assintomática e muitos eliminam o vírus espontaneamente, através dos mecanismos do próprio sistema imunológico. No entanto, o vírus foi bastante estudado em diferentes populações, procurando-se determinar sua fisiopatologia. Após vários estudos, grande parte das pesquisas não associou o GBV-C a nenhuma patologia, exceto por alguns pesquisadores que utilizaram dados não controlados^{4,5}.

O GBV-C não é mais frequentemente associado a hepatites pós-transfusionais não-A-E³¹, nem a hepatites criptogênicas não-A-E^{17, 31-35} e não foi encontrada qualquer correlação entre a viremia pelo GBV-C e os níveis de transaminases em doadores e receptores de sangue, pacientes em diálise, usuários de drogas e hemofílicos^{31,36}, assim como também não foi encontrada associação entre a viremia pelo GBV-C e a hepatite fulminante³³⁻³⁵ ou influência na severidade da hepatite pós-transplante e na sobrevida do enxerto^{31, 32, 36-39}.

Vários estudos falharam em tentar demonstrar alguma associação entre a viremia pelo GBV-C e o carcinoma hepatocelular^{14, 40, 41}, carcinoma oral⁴², linfoma não-hodgkin^{16, 43} e porfiria cutânea tardia⁴⁴. A maior parte dos estudos realizados comprovou que o GBV-C, não é o agente causador de hepatite aguda ou crônica de etiologia desconhecida e nem está associado à outra patologia.

A agência americana FDA (Food and Drug Administration), com base nestes dados decidiu não realizar a triagem para RNA do GBV-C ou dos anticorpos contra a proteína E2 em doadores de sangue dos EUA. Uma decisão de grande importância, já que existem aproximadamente 11.500.000 unidades de sangue doadas anualmente nos Estados Unidos e que a prevalência estimada de viremia pelo GBV-C entre doadores de sangue americanos gira em torno de 1 a 2%, levando a suposição de que milhares de unidades contaminadas com o GBV-C são doadas diariamente naquele país ⁴⁵.

O tratamento para indivíduos infectados pelo GBV-C não é realizado, mas estudos em pacientes portadores deste vírus e co-infectados pelo HCV demonstraram que o tratamento com interferon alfa é eficaz na erradicação da viremia pelo GBV-C ⁴⁶⁻⁴⁸.

A publicação de um grande número de trabalhos demonstrando que o GBV-C não é um vírus patogênico, fez com que o interesse por este agente fosse diminuindo consideravelmente. Entretanto, dois estudos publicados simultaneamente em 1998, renovaram o interesse por este vírus, agora sob um novo aspecto. Ambos os estudos descreveram um melhor prognóstico para os pacientes HIV positivos co-infectados pelo GBV-C, propondo que esta interação retardava a progressão da infecção pelo HIV para AIDS ^{43,44}.

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma manifestação clínica avançada da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)⁴⁹. Existem dois tipos de HIV, denominados HIV-1 e HIV-2, são membros da família *Retroviridae*, na subfamília dos lentivírus ⁵⁰⁻⁵². O HIV-1 foi isolado em 1983, sendo ele responsável pela pandemia a nível mundial. O HIV-2 é causador de epidemias localizadas, especialmente em países da África Ocidental e de um número reduzido de casos em outros continentes.

Os retrovírus caracterizam-se por terem replicação dependente de um DNA de dupla-hélice intermediário, que se forma a partir do RNA de fita única do próprio vírus, através da ação da enzima transcriptase reversa, integrando-o ao genoma da célula hospedeira⁵³. Geralmente, a infecção pelo HIV leva a uma imunodepressão progressiva, especialmente da imunidade celular e uma desregulação imunitária ⁴⁹.

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 30 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV no mundo. No Brasil, dados divulgados pelo Ministério da Saúde indicam que desde 1980 a junho de 2008 foram notificados 506.499 casos de AIDS no País, sendo 305.725 no Sudeste, 95.552 no Sul, 58.348 no Nordeste, 28.719 no Centro Oeste e 18.155 no Norte e que o número de casos vem aumentando especialmente no Norte e Nordeste do país, principalmente entre as mulheres na faixa etária de 25 a 49 anos ^{76,77}.

O HIV é transmitido pelas vias sexual, parenteral e materno-infantil ⁵⁴. Essas vias de transmissão são em sua maioria, compartilhadas com alguns outros agentes, em especial o GBV-C, determinando dessa forma a alta prevalência desta infecção em pacientes HIV positivos ^{44, 54, 55}. Na população infectada pelo HIV, a prevalência da viremia GBV-C é de 30 a 40%, se acrescida à taxa da presença do anticorpo anti-E2 nesta população os valores aumentam para 40 a 50%. A co-infecção GBV-C-HIV é muito comum, devido à ambos os vírus serem transmitidos de forma eficiente pelas vias sexual e parenteral, ressaltando a importância dos estudos realizados para a avaliação de todos os parâmetros que envolvem esta associação ^{10, 12, 58, 68}.

Vários estudos demonstraram os efeitos favoráveis da co-infecção GBV-C e HIV, com uma progressão mais lenta para AIDS e uma maior sobrevivência após o desenvolvimento da AIDS, associada a uma menor taxa de mortalidade ^{44, 55-58}. Outros estudos demonstram uma associação entre a co-infecção pelo GBV-C em pacientes HIV e um significativo aumento na contagem de células T CD4 ⁵⁵⁻⁵⁸.

O primeiro trabalho analisando a co-infecção GBV-C /HIV foi realizado a partir de uma coorte de 41 hemofílicos japoneses, infectados pelo HIV pela via transfusional em 1983 ⁴³. Neste estudo foi observado que os pacientes com viremia pelo GBV-C (27%) apresentaram menores cargas virais de HIV e uma tendência, estatisticamente não-significante, de maior tempo de evolução para AIDS e morte.

Já o estudo de Heringlake e cols ⁴⁴, encontrou uma prevalência de 17% do RNA viral, entre os 197 pacientes estudados, sendo que mais 57% tinham anticorpos anti-E2, perfazendo um índice de exposição ao GBV-C de 74%. Os indivíduos com GBV-C RNA apresentaram

um maior nível basal de CD4 (344 células/ μ L) em relação aos anti-E2 positivos (259 células/ μ L) e aos GBV-C negativos (RNA e anticorpo, 170 células/ μ L).

No ano seguinte, outro estudo realizado por Sabin e colaboradores indicou que a mortalidade de 94 ingleses hemofílicos HIV positivos não foi influenciada pelo GBV-C, sugerindo que não havia influência da co- infecção deste vírus na mortalidade relacionada aos pacientes HIV positivos. Entretanto, o estudo não fez distinção entre os pacientes que apresentavam a viremia e aqueles que já apresentavam os anticorpos anti-E2, apenas considerou todos como expostos ao vírus G⁴².

Os dados de Toyoda e Heringlake foram corroborados neste mesmo ano por um estudo realizado na França⁵⁵, a partir de uma casuística de 95 pacientes HIV positivos com soroconversão documentada, ocorrida entre 1985-1991, a maioria infectada através de contato homossexual. Com um período médio de observação de oito anos, analisou-se a amostra inicial e atual de dois grupos; um de 23 pacientes com viremia por GBV-C em todo período e outro de 72 pacientes, sendo 18 anti-E2 positivos em algum momento do estudo (15 na avaliação inicial) e os outros negativos para RNA e anticorpo. Este estudo concluiu que a viremia por GBV-C promove uma progressão mais lenta da doença pelo HIV.

O grupo alemão dando continuidade a linha de pesquisa, publicou em 2001 dados expandidos⁵⁹, avaliando também o impacto da terapêutica antiretroviral (HAART) e sua relação com a contagem de linfócitos T CD4, níveis de GBV-C RNA e HIV RNA. Além de reforçarem os achados anteriores, por terem maior prazo de observação, eles concluíram que o efeito benéfico do GBV-C RNA continuava mesmo após a introdução do HAART e que a carga viral de GBV-C possuía uma relação inversa à de HIV, mas nenhuma relação com a contagem de CD4⁶⁰, concluindo que o GBV-C parece diminuir a replicação do HIV, indicando um efeito inibitório direto.

Neste mesmo ano, um grupo de Iowa⁵⁸ publicou dados da mesma natureza em 362 pacientes observados por 4,1 anos, verificando uma mortalidade mais acentuada entre os GBV-C -RNA negativos (56,4%) em relação aos GBV-C -RNA positivos (28,5%). Também obtiveram evidências “in vitro” da inibição da replicação do HIV pelo GBV-C em culturas de células mononucleares co-infectadas.

Outro dado interessante foi obtido por Rodriguez e colaboradores⁶¹, observando que os pacientes com viremia pelo GBV-C apresentavam uma melhor resposta ao HAART e uma magnitude de reconstituição imune (aumento de CD4) independente dos níveis basais de CD4 e carga viral de HIV).

Em 2004, Williams e colaboradores⁶², publicaram uma avaliação de 271 pacientes seguidos desde a soroconversão até 11 anos após, analisando-se tanto a viremia quanto a presença do anticorpo anti-E2 de GBV-C. A grande maioria dos pacientes apresentou algum marcador de GBV-C (46% anticorpo, 39% viremia) e 9% dos pacientes clarearam a infecção por GBV-C entre a primeira e a última avaliação. A melhora na sobrevivência foi mais acentuada após um período mais longo de observação. Os autores verificaram que o pior prognóstico foi apresentado pelos pacientes que clarearam a infecção pelo GBV-C e concluíram então que, a influência do tempo de infecção pelo HIV, pode explicar os resultados contraditórios de outros estudos quanto ao efeito protetor do GBV-C.

Na tentativa de explicar os mecanismos pelos quais o GBV-C, influenciava de forma a inibir a replicação do HIV, foram realizados vários estudos que indicavam um efeito inibitório direto. Um primeiro modelo sugerido por Natterman e colaboradores⁶³, que demonstrou o efeito inibitório direto, baseado no fato de que ambos os vírus replicam nas células mononucleares do sangue periférico, analisou a expressão de um dos receptores celulares utilizados pelo HIV, o CCR5, em linfócitos de pacientes HIV positivos e negativos e concomitantemente GBV-C -RNA positivos ou negativos, demonstrando que a infecção pelo GBV-C promove o aumento na secreção de citocinas e a diminuição da expressão do receptor CCR5, sugerindo, portanto ser este o meio pelo qual o GBV-C retarda a progressão da doença por HIV.

Outros estudos vieram a apoiar esta pesquisa demonstrando que a glicoproteína E2 do envelope do GBV-C se liga ao receptor do CD81 dos linfócitos T, resultando no aumento de secreção de citocinas RANTES, que é um ligante natural do co-receptor CCR5, usado pelo HIV para entrada nas células-alvo^{64,65}. Usando uma metodologia diferente, Xiang e colaboradores⁶⁶ obtiveram resultados semelhantes e mostraram que também ocorre o bloqueio do receptor CXCR4 através da expressão aumentada de ligantes naturais deste receptor (citocinas).

Os estudos em co-infectados GBV-C/HIV demonstraram de forma inequívoca que a viremia pelo GBV-C está associada a um aumento na sobrevida em relação aos não-infectados, um retardamento na queda de linfócitos CD4 e menores valores de carga viral de HIV. A elucidação dos mecanismos moleculares destes efeitos benéficos poderá levar a novas abordagens terapêuticas⁶⁷ e o status GBV-C, certamente deverá ser mais uma variável a ser analisada nos próximos estudos em HIV/AIDS.

No entanto, a maioria absoluta dos estudos envolvendo a interação GBV-C x HIV, determinou o status GBV-C através de métodos qualitativos, sejam estes sorológicos e/ou moleculares. É evidente que o estudo da associação entre variáveis quantitativas como contagem de células CD4+ e carga viral de HIV com uma variável binária como o status GBV-C + ou -, pode obscurecer certas relações evidenciadas por gradientes biológicos. Desta forma é possível que haja diferenças importantes entre um paciente com alta carga de GBV-C e outro com uma viremia baixíssima. Este detalhamento só poderá ser averiguado com uma metodologia que permita não apenas detectar o RNA viral plasmático mas também ser capaz de quantificá-lo com precisão.

Além de métodos que possam avaliar de forma mais criteriosa os dados desta co-infecção, a maioria dos estudos realizados utilizaram coortes exclusivamente masculinas, ou predominantemente masculinas, deixando uma lacuna sobre os valores desta co-infecção encontrados em uma população exclusivamente feminina.

1.2- Reação de PCR em tempo real

A técnica de amplificação enzimática da seqüência genômica da β -globina e análise do sítio de restrição, em portadores de anemia falciforme, elaborada por K. Mullis e desenvolvida pela equipe de cientistas da Cetus Corporation, foi publicada pela primeira vez em 1985 na Science⁶⁹ e aclamada como uma das mais poderosas ferramentas da biologia molecular.

Com as dificuldades apresentadas pela técnica de PCR convencional, pesquisadores buscaram aperfeiçoar e suprir as deficiências da técnica anterior o que gerou nos últimos 10 anos, a evolução dos termocicladores, das marcações químicas de DNA com compostos fluorescentes e a miniaturização das câmeras tipo CCD levando à invenção do PCR em tempo real. Inicialmente, a amplificação produzia um aumento na quantidade de DNA de dupla fita no qual o brometo de etídeo se ligava, resultando em um aumento da fluorescência, o procedimento era realizado em um termociclador adaptado para irradiar as amostra com luz ultravioleta e a fluorescência emitida era captada por uma câmera CCD. O sistema era capaz de indicar a quantidade de alvo inicial de uma amostra durante a PCR, por avaliar a produção do produto de PCR a cada ciclo^{70,71}.

O aperfeiçoamento foi realizado utilizando o SYBR Green no lugar do brometo de etídeo como intercalante, por possuir uma afinidade maior com o DNA de fita dupla. A fluorescência é medida apenas no momento da extensão, tornando a reação mais específica, a medida é realizada por filtros específicos selecionados e os resultados fornecidos por um software próprio do equipamento.

Esta metodologia, apesar de representar um avanço, trazia a desvantagem de que o intercalante se ligava a produtos de PCR não específicos de dupla fita, o que tornava a quantificação passível de erros. Para corrigir isto, foi desenvolvido um sistema que usa sondas marcadas internas ao amplicon, garantindo a emissão de fluorescência apenas quando o alvo específico estivesse sendo amplificado.

Em 1991, um estudo realizado por Holland⁷² e colaboradores demonstrou que a clivagem de uma sonda alvo durante a PCR pela atividade 5' nucleasase da Taq DNA polimerase poderia ser utilizada para detectar a amplificação de um alvo específico, pois o sistema desenvolvido garantia que a clivagem da sonda só ocorresse quando o a seqüência alvo estivesse sendo amplificada.

Simultaneamente, Lee e colaboradores⁷³ desenvolveram uma forma de eliminar o processamento dos resultados pós-PCR com o desenvolvimento de sondas fluorogênicas. A sonda era marcada com um composto fluorescente na extremidade 5' e um composto que impede a fluorescência do primeiro, quando ambos encontram-se fisicamente próximos,

denominado “*quencher*”. Assim quando houvesse o pareamento dos primers e a extensão da seqüência alvo, a sonda era quebrada pela ação da Taq polimerase e o composto fluorescente era separado do “*quencher*”, liberando então uma fluorescência, sendo interpretado como uma cópia de DNA.

A emissão de fluorescência do produto de PCR é medida a cada ciclo, daí o nome PCR em tempo real. Na fase exponencial, a quantidade inicial da seqüência alvo está diretamente relacionada com esta emissão, ou seja, quanto maior o número de cópias inicial, mais cedo ocorrerá a emissão de fluorescência, acima de um valor basal denominado “*threshold*”.

A validação de um PCR em tempo real para GBV-C poderá ser muito útil à pesquisa de HIV/AIDS, pois, é uma técnica de fácil execução liberando os resultados de um grande número de pacientes de forma rápida, apresentando as vantagens de ter uma boa especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, além de diminuir os riscos de contaminação por um menor manuseio das amostras, qualificando e quantificando as amostras positivas.

2. Justificativa

O presente estudo foi proposto considerando-se que:

Estudos realizados em co-infectados GBV-C/ HIV demonstraram que a viremia pelo GBV-C está associada com uma progressão mais lenta para AIDS e o aumento da sobrevivência dos pacientes após o desenvolvimento da AIDS, devido a uma diminuição na queda de linfócitos CD4 e valores de carga viral de HIV menores.

Entretanto, estes estudos foram em sua maioria realizados com casuística predominantemente ou exclusivamente masculina, ressaltando a importância de novos dados provindos de uma coorte feminina.

A determinação do status GBV-C nestes estudos, foi majoritariamente através de métodos qualitativos, sejam eles sorológicos e/ou moleculares. O desenvolvimento de uma técnica de PCR em tempo real para detecção do GBV-C, permite correlacionar os dados qualitativos aos quantitativos, fornecendo informações mais completas e específicas das amostras positivas para GBV-C.

3. Objetivos

- Desenvolver uma metodologia de PCR em tempo real para GBV-C/RNA e fazer a determinação das cargas virais de GBV-C.

- Avaliar a soroprevalência e viremia (qualitativa) por GBV-C nas amostras de pacientes infectadas pelo HIV, coletadas entre 1997-1999 e arquivadas em plasmoteca a -70°C.

4. Materiais e Métodos

4.1 – Amostras

As amostras de plasma foram coletadas durante a execução do projeto de estudo da infecção pelo Papilomavírus Humano em pacientes HIV positivas⁷⁴, realizado anteriormente no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (LIM 52 – HCFMUSP).

A coleta das amostras foi realizada entre 1997- 1999 no Instituto de Infectologia Emílio Ribas e na Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Casa da AIDS), durante o acompanhamento e tratamento das pacientes infectadas pelo HIV e armazenadas a -70°C desde então.

Foram utilizadas da plasmateca 253 amostras HIV positivas, as quais apresentavam quantidade suficiente para realização dos ensaios de determinação do status GBV-C. Obtivemos através de arquivo, os valores de carga viral do HIV e contagem de CD4 de todas as amostras utilizadas; estes testes foram realizados logo após a coleta dando seqüência ao acompanhamento das pacientes em tratamento nas instituições citadas.

Tabela 1: Pacientes do estudo divididas por faixa etária.

FAIXA ETÁRIA	18 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	≥ 61	TOTAL
Nº DE MULHERES	07	80	101	56	8	01	253

O estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do II Emílio Ribas, da Casa da AIDS e da Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq –

da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 029/06).

4.2 – Determinação qualitativa de anticorpos anti-E2 GBV-C

Realizamos a importação dos kits de detecção de anticorpo específico anti-E2. Este kit é um ensaio imunoenzimático comercial (μ Plate antiHGenv teste, Roche Diagnostics, Penzburg – Alemanha) realizado com soro/plasma humano e foi doado pelo Dr. Dietmar Zdunek da empresa Roche Diagnostics, Penzburg – Alemanha.

Foram submetidas ao ensaio as 253 amostras de plasma da soroteca, cada amostra correspondendo a uma paciente. A reação de Elisa foi realizada conforme indicação do fabricante do kit e abaixo descrito.

As amostras e os controles foram diluídos (1:20) e pipetados 20 μ l em cada poço da placa, seguido de 80 μ l da solução de incubação contendo o antígeno-GBV-C-E2 e incubados no *shaker* por 2 horas. Após lavagem, foi adicionado 100 μ l do conjugado que contem o anticorpo anti-h-Fc γ em cada poço e novamente incubados por 1 hora no *shaker*. Feita nova lavagem e adicionado 100 μ l do substrato contendo o cromógeno em cada poço, foram incubados por mais 1 hora, homogeneizando protegidos da luz. Em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro na faixa de 405 η m.

Avaliados os critérios do fabricante para definir o *cut-off*, determinamos as amostras positivas e negativas. As amostras com resultado em torno de $\pm 15\%$ do valor do *cut-off*, foram repetidas e as que continuaram dentro desta classificação foram para o teste confirmatório, como indicado pelo fabricante.

4.2.1 – Teste confirmatório para de detecção do anticorpo específico anti-E2

As amostras positivas ou indeterminadas foram submetidas ao teste confirmatório. Em contraste ao procedimento normal do teste, a solução de incubação não continha o antígeno-GBV-C -E2, ou seja, não havendo possibilidade das amostras positivas para o anti-E2 apresentarem reação colorimétrica por não ocorrer a ligação antígeno-anticorpo. Os outros passos foram seguidos normalmente.

Havendo a diminuição da densidade ótica em mais de 1,5X em relação á leitura inicial conclui-se que é um positivo confirmado. Ocorrendo o inverso, trata-se de um falso-positivo, uma amostra que contém anticorpos contra um antígeno semelhante ao E2, mas que não é o próprio, já que a absorbância se mantém na ausência do mesmo.

4.3 – Extração de RNA da amostra

Para obtenção de RNA das amostras de plasma foi utilizado o kit de extração QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen®,Chattlesworth, EUA). Como indicado pelo fabricante, foram pipetados 560 µl de tampão AVL em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e adicionados 140 µl de plasma da amostra, agitando-se em seguida por 15 segundos e incubando-se em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugando-se rapidamente e adicionando-se 560 µl de etanol 100%, agitando-se novamente. Em seguida foram aplicados 630 µl da solução de lavagem na coluna “QIAamp spin” e centrifugou-se a 6000 x g por 1 minuto, descartando-se o filtrado. Foi repetido o procedimento anterior e realizadas as lavagens como indicado no kit. Ao final obtivemos um eluato de RNA de 60 µl de cada amostra.

4.4 – Reação de Transcrição Reversa

Para a etapa da síntese do DNA complementar- cDNA foi utilizado um protocolo “in-house” com hexâmeros randômicos (PDN, N6, Invitrogen®, CA, EUA) e a enzima transcriptase reversa de M-MLV (Invitrogen®, São Paulo, Brasil).

Na primeira etapa da reação de síntese de cDNA, procedeu-se uma linearização do RNA, ajustando-se no termociclador Eppendorf gradient (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) a temperatura para 65°C durante 5 minutos, e utilizando-se o mix I, constituído pelo tampão, os nucleotídeos (dNTPs), o cloreto de magnésio (MgCl₂), o inibidor de RNAses (RNase-Out 40U/µl - Invitrogen®, CA, EUA), o DTT (Invitrogen®, CA, EUA) e o RNA extraído, conforme a tabela 2.

Na segunda etapa da reação, o termociclador Eppendorf gradient (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) foi ajustado para 22° C durante 10 minutos, acrescentando-se ao mix I, 5,5 µl do mix II, constituído pela enzima M-MLV, a água livre de RNAses e os primers

randômicos, nas concentrações indicadas na tabela 3. Seguindo-se o programa 37° C por 30 minutos e 95° C por 5 minutos, para inativação da enzima M-MLV. Finalmente o cDNA ficou a 4° C no termociclador, sendo removido e estocado no freezer a -20° C.

Tabela 2: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na primeira etapa da reação de transcrição reversa (mix I).

Reagente	Volume (µl)	[final]
Tampão PCR 10x minus Mg	4,0	1x
dNTPs (2,5mM)	3,2	0,2mM
MgCl ₂ (50mM)	4,0	5mM
RNAsin (40U/ µl)	1,0	1U
DTT	0,4	3M
Volume final	12,6	
cDNA	22,0	
Volume da reação	34,6	

Tabela 3: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na segunda etapa da reação de transcrição reversa (mix II).

Reagente	Volume (µl)	[final]
PDN (50 µM)	2,0	2,5 µM
M-MLV(200U/ µl)	0,5	2,5U
H2O DEPC	3,0	
Volume final	5,5	
Volume mix I + mix II	40,1	

4.5 – Reação de PCR GBV-C Convencional

A padronização da PCR convencional para detecção de GBV-C RNA nas amostras foi feita utilizando primers previamente publicados, que amplificam uma porção da região 5`NCR por esta ser a parte mais conservada do vírus³⁰. O procedimento amplificou as amostras positivas a partir de 5 µl de cDNA em uma reação de PCR de volume final de 25 µl, usando os primers antisense LG1 (5' CACTGGTCCTTGTCAACTCGC 3'), sense LG2 (5' CACTGGGTGCAAGCCCCAGAA 3') e reagentes como indicado na tabela 4.

A reação consistiu de uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e incubação final de 72°C por 5 minutos. As amostras positivas, foram detectadas por eletroforese com brometo de etídeo em gel de agarose a 2%. Foram utilizados também controles positivos e negativos a cada reação. Os controles são amostras de plasma doadas pelo Banco de sangue do Hospital Sírio Libanês, já devidamente testadas e classificadas como negativa para todos os agentes infecciosos inclusive para o GBV-C no caso do controle negativo, Já o controle positivo passou pelos mesmos testes porém, apresentou-se positivo apenas para o GBV-C. Este material foi aliqotado e guardado refrigerado a -80°C.

Tabela 4: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação de PCR GBV-C convencional.

Reagentes	Volume (µL)	[Final]
Tampão de PCR 10X minus Mg	2,5	1x
dNTPs (2,5mM)	2,0	200 µM
MgCl ₂ (50mM)	1,5	3,0mM
LG 1 (10µM)	0,5	200 ηM
LG 2 (10µM)	0,5	200 ηM
Taq Platinum (5U/ µL)	0,25	1,25U
H2O DEPEC	7,75	-
Glicerol 57%	2,5	5,70%
Cresol Red (1µg/ µL)	2,5	0.1µg/ µL
Volume Final	20,0	
cDNA	5,0	
Volume de Reação	25 µL	

4.6 – Reação de NESTED PCR GBV-C

A reação de Nested PCR GBV-C foi padronizada utilizando os primers publicados por Andonov⁷⁵ e colaboradores. Neste estudo, os pesquisadores avaliaram 6 diferentes conjuntos de primers e o de maior sensibilidade foi adotado por nós, conforme abaixo.

Para o primeiro tempo utilizamos 5 µl de cDNA que foi submetido ao PCR usando os primers G58 sense (5' CAGGGTTGGTAGGTCGTAAATCC 3') e G75 antisense (5' CCTATTGGTCAAGAGAGACAT 3') e para o segundo tempo utilizamos 2,5 µl do produto de PCR do primeiro tempo que foi amplificado pelos primers G134 sense (5' GGTCAYCYTGGTAGCCACTATAGG 3') e G131 antisense (5' AAGAGAGACATTG WAGGGCGACGT 3') e reagentes nas concentrações e volumes mostrados na tabela 5.

Para ambos os tempos, a reação foi realizada em um volume total de 25 µl, a denaturação ocorreu a 95°C por 5 minutos, seguida por 25 ciclos de amplificação a 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos e incubação final de 72°C por 5 minutos. O produto final da reação de NESTED PCR foi detectado por eletroforese com brometo de etídeo em gel de agarose a 2%, sendo utilizados os mesmos controles positivos e negativos derivados das alíquotas de plasma doadas pelo Banco de sangue do Hospital Sírio Libanês.

Tabela 5: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação de Nested PCR GBV-C.

Reagentes	Volume(μ L)	[Final]	Reagentes	Volume(μ L)	[Final]
1º PCR			2º PCR		
Tampão de PCR 10X minus Mg	2,5	1x	Tampão de PCR 10X minus Mg	2,5	1x
dNTPs (2,5mM)	2,0	200 μ M	dNTPs (2,5mM)	2,0	200 μ M
MgCl ₂ (50mM)	1,25	2,5mM	MgCl ₂ (50mM)	1,25	2,5mM
G58 (10 μ M)	0,5	200 η M	G134 (10 μ M)	0,5	200 η M
G75 (10 μ M)	0,5	200 η M	G131 (10 μ M)	0,5	200 η M
Taq Platinum (5U/ μ L)	0,25	1,25U	Taq Platinum (5U/ μ L)	0,25	1,25U
H ₂ O	8,0		H ₂ O	10,5	
Glicerol 57%	2,5		Glicerol 57%	2,5	
Cresol Red 1 μ g/ μ L	2,5		Cresol Red 1 μ g/ μ L	2,5	
Volume Final	20,0		Volume Final	22,5	
cDNA	5,0		1st round PCR prod.	2,5	
Volume de Reação	25,0		Volume de Reação	25,0	

4.7 – Validação da PCR em tempo real para GBV-C

O estudo da padronização de um PCR em tempo real para GBV-C iniciou-se com a escolha do melhor método para avaliar a sequência alvo, levando em consideração as características filogenéticas e físico-químicas da mesma. Optamos por desenvolver um ensaio baseado no sistema Taqman, por apresentar maior especificidade.

A sonda se liga a sequência alvo dez graus acima da temperatura de ligação dos primers para garantir que ela seja sempre a primeira a se ligar na sequência alvo, até aí ela ainda não emite fluorescência, pois a proximidade entre o *quencher* e o *reporter* impede que isto ocorra. Após diminuir os dez graus, na fase de pareamento, os primers se ligam ao alvo e a enzima Taq polimerase promove a síntese da nova fita ao mesmo tempo exerce sua atividade exonucleásica clivando a sonda que passa a liberar um sinal de fluorescência, que será captado pelos filtros e analisado como uma cópia da sequência alvo.

4.7.1 – Definição do ensaio e dos primers

Desenvolvemos um ensaio baseado no sistema Taqman, que se vale da atividade exonucleolítica da Taq Polimerase para digerir uma sonda cuja região de hibridização é interna aos do fragmento delimitado pelos primers de amplificação. Esta sonda é marcada com um composto fluorescente na extremidade 5' e um composto que impede a fluorescência do primeiro, quando ambos encontram-se fisicamente próximos, denominado “*quencher*”.

O estudo das seqüências de primers vai além das propriedades teóricas de qualquer primer, pois deve atender também as características físico-químicas desejáveis ao ensaio de Taqman, mas também e principalmente, cobrir a variação molecular naturalmente observada no genoma-alvo. No caso específico da detecção e quantificação do GBV-C, buscamos atender ambas as exigências filogenéticas e físico-químicas, usando os dados de diversidade de seqüência dos diferentes genótipos de GBV-C para selecionar os primers idealmente mais conservados, e ao mesmo tempo, procurando desenhar uma sonda interna que possuísse as desejadas propriedades.

Por analogia ao HCV, e revisando os trabalhos que fizeram comparações das melhores regiões gênicas para alvo de diagnóstico molecular para GBV-C, ficou evidente que deveríamos focar na região 5'NCR. É a região mais conservada tanto do HCV quanto do GBV-C, e aquela que dois estudos diferentes obtiveram as maiores prevalências, ou seja, maior sensibilidade^{60,85}.

Após esta definição, iniciamos a busca por primers já disponíveis na literatura, avaliados contra diferentes genótipos de GBV-C, e delimitando amplicons com tamanho inferior a 200 pares de bases, característica esta desejável em PCR em tempo real. A sonda por sua vez também deveria atender exigências de sonda Taqman, descritas e analisáveis pelo programa Primer Express (Applied Biosystems) instalado em nossos equipamentos de PCR em tempo real. Após muitas análises, obtivemos o conjunto de primers/sonda .

Como descrito na tabela 6, o ensaio foi produzido pela empresa Applied Biosystems que faz o Assay Mix, reagente que já vem pronto para uso como uma mistura 20X concentrada. No Assay Mix está incluso tudo que é necessário para que a reação de PCR

ocorra, como: os primers, a sonda, o tampão, a enzima Taq, os dNTPs, e o normalizador de fluorescência ou referência passiva, que controla para as variações de fluorescência que podem ocorrer por causas não relacionadas ao ensaio Taqman propriamente, como diferenças de volume e etc. Neste ensaio o fluoróforo utilizado para este fim é o ROX.

Para realizar a reação, foi só adicionar à mistura o cDNA e levar ao equipamento de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 – Applied Biosystems). Este procedimento utilizou o primer sense RTG1 (5' GTGGTGGATGGGTGATGACA 3'), o primer antisense RTG2 (5' GACCCACCTATAGTGGCTACCA3') e a sonda antisense (5'FAM-CCGGGATTTACGACCTACC-NFQ3'), onde FAM é o composto fluorescente ou “reporter“, e NFQ significa “non-fluorescente quencher”. Seguindo o protocolo de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. As amostras positivas, amplificaram uma seqüência de 72 pb e tiveram suas cargas virais quantificadas pelo próprio equipamento de PCR em tempo real, baseado na curva padrão.

Tabela 6: Reagentes, volumes e concentrações utilizados no PCR em tempo real.

Reagente	Volume (µl)
TaqMan Universal PCR Master Mix 2X	10,0
20X Assay Mix	1,0
cDNA	9,0
Volume Final	20,0
Concentração dos Primers	18 µM
Concentração da Probe	5µM

4.7.2 – Calibração do ensaio e curva – padrão.

Para obterem-se dados quantitativos (carga viral) sempre é necessário haver em cada corrida, alguns tubos/poços que contém cDNAs derivados de concentrações previamente conhecidas de uma amostra-padrão. Estas diluições da amostra-padrão são colocadas para o software de gerenciamento da reação como controles (Qc) aos quais se atribuí um valor

quantitativo em qualquer unidade estabelecida, cópias/mL, unidades internacionais/mL, genoma-equivalentes/mL etc.

Como não há até este momento, uma padronização quanto ao GBV-C RNA, optamos por criar um padrão interno do laboratório, para o qual existe material abundante e que possa ser analisado muitas vezes. Obtivemos uma bolsa de plasma já previamente identificada poconter GBV-C RNA e estar livre de outros agentes infecciosos como HBV, HCV e HIV. Esta bolsa de cerca de 350 mL de plasma foi gentilmente doada pelo Banco de Sangue do Hospital Sírio-Libanês de São Paulo. Ao chegar ao Laboratório de Virologia do IMT a bolsa foi descongelada e o plasma imediatamente aliquotado em microtubos contendo 0,5 mL de plasma cada um. Uma alíquota foi então diluída com plasma normal GBV-C negativo, de forma a gerar uma curva de titulação, partindo-se do plasma puro até uma diluição de 1:100.000. Triplicatas de cada ponto (puro-1:5 - 1:10 - 1:100 - 1:1.000 - 1:10.000 - 1:100.000) foram extraídas e processadas conforme descrito anteriormente. Os cDNAs forma submetidos à reação de PCR em tempo real. Observamos que até a diluição de 1:10.000 havia uma amplificação consistente e reprodutível. A partir deste resultado determinamos que a bolsa-padrão contém uma carga viral de 10.000 unidades-aleatórias (UA/mL) de GBV-C RNA por mililitro de plasma.

Nesta fase de testes para validação da curva-padrão, observamos um fenômeno ao qual descrevemos como uma inibição causada por excesso de RNA viral, onde a amostra pura e na diluição 1:5 apresentaram um Ct superior ao das outras diluições, o que fez com que esses pontos fossem retirados da curva garantindo a reprodutibilidade do ensaio. Assim nossa curva ficou com quatro pontos que foram colocados em todos os ensaios sempre em triplicatas (1:10, 1:100, 1:1.000, 1: 10.000).

4.7.3 – Teste de avaliação da interferência de outros vírus na reação de PCR em tempo real para GBV-C.

Realizamos um ensaio de PCR em tempo real para GBV-C, com amostras de pacientes sabidamente RNA positivos para HCV e Dengue. Escolhemos estes vírus por serem da mesma família *Flaviviridae* o que aumentaria a chance de uma amplificação inespecífica se houvesse uma falha nos primers escolhidos.

Neste teste utilizamos os mesmos critérios que foram realizados nos ensaios com as amostras das pacientes como: A curva padrão em Triplicata, com quatro pontos; o controle positivo para GBV-C e um controle negativo. Na reação foram testadas 20 amostras sendo 10 positivas para HCV e 10 positivas para Dengue.

5. Resultados

5.1- Sorologia

Analisamos os resultados da pesquisa qualitativa de anticorpos anti-E2 GBV-C, realizada nas 253 amostras. Na primeira análise obtivemos 64 amostras positivas, 43 indeterminadas e 146 negativas. Em seqüência, todas as amostras que estavam indeterminadas foram repetidas e apenas 5 revelaram-se positivas, as demais foram todas negativas. Assim, realizamos o teste confirmatório em 69 amostras positivas e 5 amostras que eram positivas já no primeiro Elisa continuaram a ser positivas, sendo consideradas amostras com resultado falso- positivo.

No teste confirmatório, a incubação é feita na ausência do antígeno E2, ou seja, todas as amostras deveriam ter resultados negativos para este teste, considerando que estas são positivas para GBV-C e o anticorpo não teria onde se ligar. O resultado final desta análise foi de 64 positivos e 189 negativos.

5.2 – PCR GBV-C convencional

A reação de PCR convencional para GBV-C, utilizando os primers LG1 e LG2 amplificou uma seqüência de 367pb em 36 amostras, sendo 217 negativas.

Este método avaliou a presença de RNA GBV-C nas amostras de forma qualitativa. Em todas as corridas de PCR houve a presença dos controles positivos e negativos que passaram pelos mesmos procedimentos das amostras até a obtenção dos resultados, como mostra a figura 1.

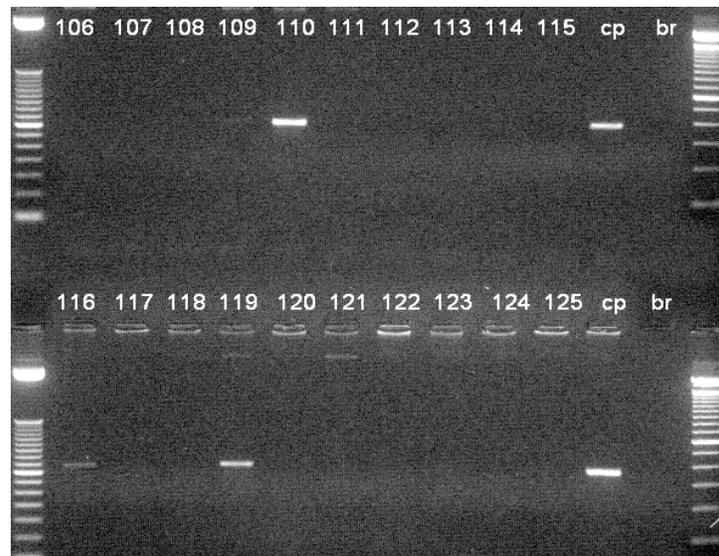


Figura 1: Fotografia de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (Alphaimager® EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente à PCR GBV-C convencional com três amostras positivas (Am110, Am116 e Am119) além do controle positivo (cp) e do controle negativo (br).

5.3 – Nested PCR GBV-C

A realização do ensaio de Nested PCR para GBV-C foi pensada com o intuito de detectar amostras positivas com cargas virais baixas. Devido ao tempo de estocagem das mesmas, havia a possibilidade de uma diminuição dos níveis de RNA nas amostras, ao mesmo tempo o resultado deste ensaio serviu para avaliar o método de Tempo Real para GBV-C.

Assim como o PCR convencional, este método avaliou a presença de RNA GBV-C nas amostras de forma qualitativa e em todas as corridas houve a presença dos controles positivos e negativos, como mostra a figura 2. As reações positivas tiveram como resultado a amplificação de um produto de PCR de 241pb e 208pb, respectivamente do primeiro e segundo tempo. No resultado final foram observadas 57 amostras positivas, sendo 36 que já eram positivas no PCR convencional e 21 novas amostras positivas apenas para o Nested GBV-C e 196 negativas.

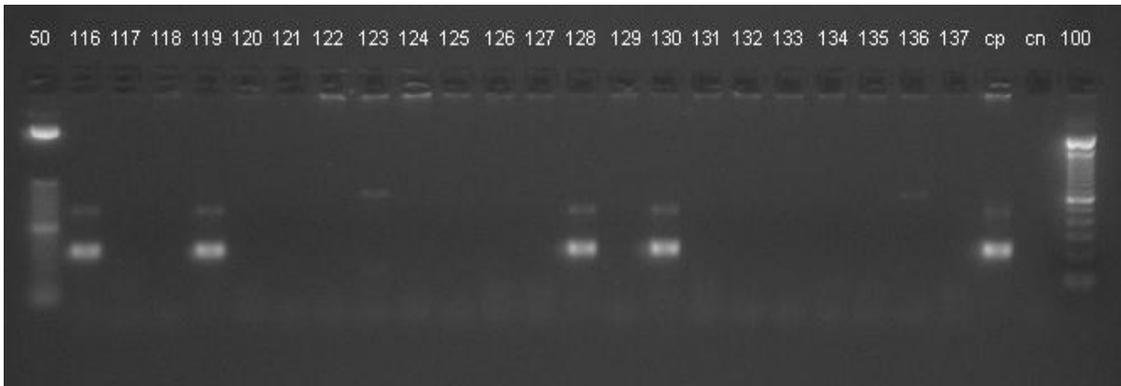


Figura 2: Fotografia de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (Alphaimager® EC, Alpha Innotech Corporation, EUA) referente à reação de Nested PCR GBV-C com quatro amostras positivas (Am116, Am119, Am128 e Am130) além do controle positivo (cp) e negativo (cn).

5.4 – PCR em tempo real para GBV-C

5.4.1 - Calibração do ensaio e curva padrão

As corridas realizadas para calibração do ensaio de real time, foram feitas com o cDNA da amostra padrão, derivada da bolsa de plasma doada pelo Banco de Sangue do Hospital Sírio-Libanês de São Paulo. Os testes foram feitos com triplicatas de cada ponto, partindo do plasma puro até a diluição de 1:100.000, como já descrito anteriormente em métodos. Conseguimos quantificar a bolsa-padrão através desta diluição, que apresentou uma carga viral de 10.000 unidades-aleatórias de GBV-C -RNA por mililitro de soro, obtendo-se sempre valores de Ct (Cycle Treshold) de 38 ± 1 .

Ao realizarmos as corridas, observamos um fenômeno que pode ser notado nas figuras 3 e 4, ao qual reputamos ser uma inibição causada por excesso de RNA viral (cDNA), onde a amostra pura apresenta um Ct superior ao das diluições 1:5 e 1:10, algo que ocorreu também com a diluição 1:5 em outras corridas, e para garantirmos a reprodutibilidade do ensaio esse ponto também foi eliminado e nossa curva ficou com quatro pontos (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000) que foram colocados em todas as corridas sempre em triplicata (figuras 5 e 6).

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty
D1	hgv 1:5	taqman hgv	Unknown	24.24	0.113	
E1	hgv 1:5	taqman hgv	Unknown	24.26	0.113	
F1	hgv 1:5	taqman hgv	Unknown	24.44	0.113	
A2	hgv 1:10	taqman hgv	Unknown	25.45	0.400	
G1	hgv 1:10	taqman hgv	Unknown	26.02	0.400	
B1	hgv puro	taqman hgv	Unknown	26.85	0.497	
C1	hgv puro	taqman hgv	Unknown	27.55	0.497	
C2	hgv 1:1000	taqman hgv	Unknown	28.68	0.092	
B2	hgv 1:100	taqman hgv	Unknown	28.80	0.092	
D2	hgv 1:100	taqman hgv	Unknown	28.86	0.092	
F2	hgv 1:1000	taqman hgv	Unknown	32.02	0.157	
E2	hgv 1:1000	taqman hgv	Unknown	32.07	0.157	
G2	hgv 1:1000	taqman hgv	Unknown	32.31	0.157	
A3	hgv 1:10000	taqman hgv	Unknown	35.40	0.021	
B3	hgv 1:10000	taqman hgv	Unknown	35.43	0.021	
C3	hgv 1:100000	taqman hgv	Unknown	37.13	1.063	
D3	hgv 1:100000	taqman hgv	Unknown	38.23	1.063	
E3	hgv 1:100000	taqman hgv	Unknown	39.25	1.063	
F3	branco	taqman hgv	Unknown	Undet.		
G3	branco	taqman hgv	Unknown	Undet.		
H3	branco	taqman hgv	Unknown	Undet.		

Figura 3: Relatório do PCR em tempo real de corrida apenas com o cDNA da amostra padrão, utilizada para gerar a curva de calibração e quantificação, onde a amostra pura apresenta um Ct superior ao das diluições 1:5 e 1:10.

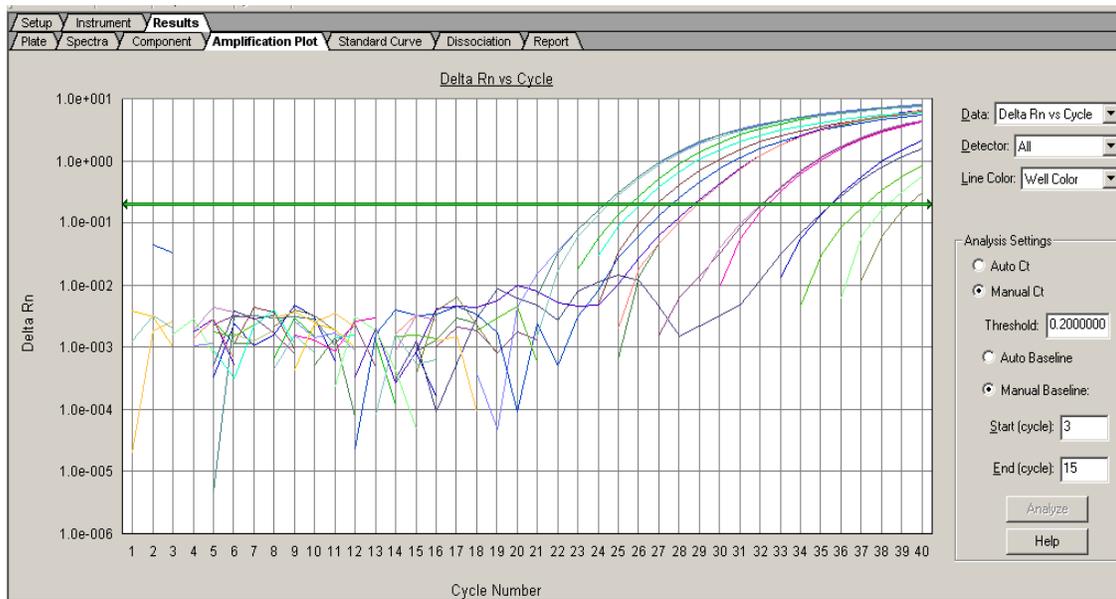


Figura 4: Gráfico de amplificação correspondente ao relatório acima.

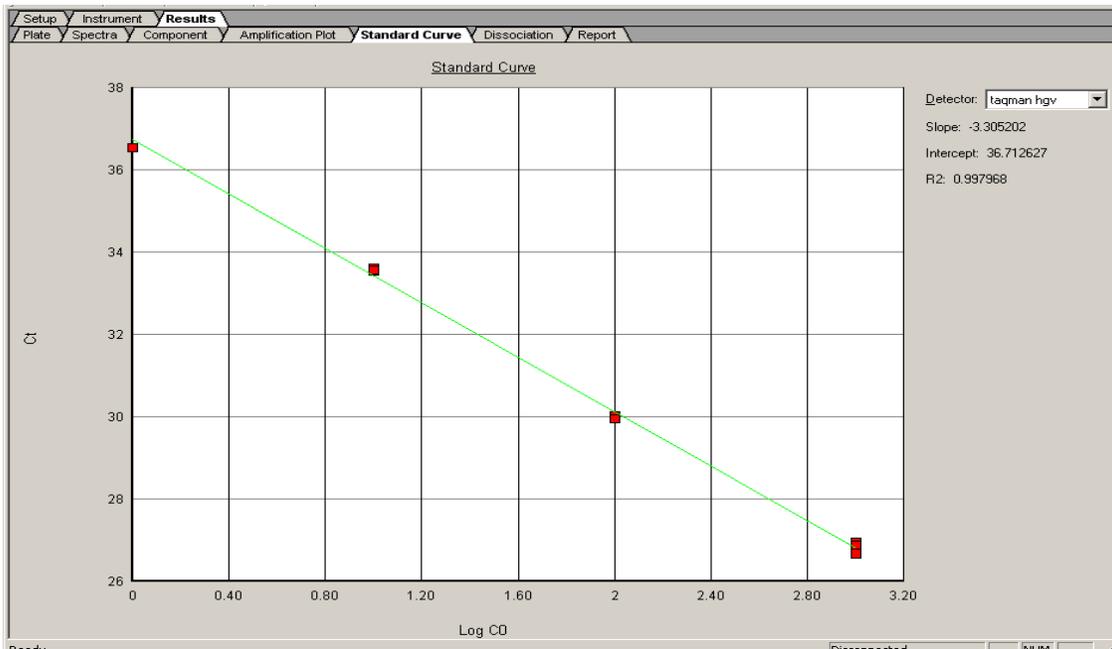


Figura 5: Curva de Calibração.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty
A1	1:10	taqman hgv	Standard	26.96	0.148	1000.00		
A2	1:10	taqman hgv	Standard	26.87	0.148	1000.00		
A3	1:10	taqman hgv	Standard	26.67	0.148	1000.00		
A4	1:100	taqman hgv	Standard	29.94	0.034	100.00		
A5	1:100	taqman hgv	Standard	30.01	0.034	100.00		
A6	1:100	taqman hgv	Standard	29.96	0.034	100.00		
A7	1:1000	taqman hgv	Standard	33.53	0.035	10.00		
A8	1:1000	taqman hgv	Standard	33.60	0.035	10.00		
A9	1:1000	taqman hgv	Standard	33.56	0.035	10.00		
A10	1:10000	taqman hgv	Standard	Undet.				
A11	1:10000	taqman hgv	Standard	Undet.				
E1	99	taqman hgv	Unknown	30.47	0.536	77.66	110.77	43.430
E2	99	taqman hgv	Unknown	30.18	0.536	94.71	110.77	43.430
E3	99	taqman hgv	Unknown	29.43	0.536	159.94	110.77	43.430
E11	102	taqman hgv	Unknown	Undet.				
E12	102	taqman hgv	Unknown	Undet.				
F1	103	taqman hgv	Unknown	30.85	0.082	59.23	56.13	3.209
F2	103	taqman hgv	Unknown	30.93	0.082	56.35	56.13	3.209
F3	103	taqman hgv	Unknown	31.02	0.082	52.82	56.13	3.209
F4	104	taqman hgv	Unknown	27.07	0.031	827.65	820.29	17.478
F5	104	taqman hgv	Unknown	27.12	0.031	800.34	820.29	17.478
F6	104	taqman hgv	Unknown	27.06	0.031	832.89	820.29	17.478
F7	105	taqman hgv	Unknown	27.90	0.090	463.93	438.70	27.420
F8	105	taqman hgv	Unknown	27.97	0.090	442.64	438.70	27.420
F9	105	taqman hgv	Unknown	28.08	0.090	409.52	438.70	27.420
F10	106	taqman hgv	Unknown	Undet.				

Figura 6: Relatório mostrando os Cts dos calibradores (Standard) e as cargas virais de algumas amostras (Unknown).

5.4.2 – Avaliação de interferência

O ensaio realizado com 20 amostras sendo, 10 positivas para RNA-HCV e 10 positivas para RNA-Dengue comprovou que não houve inespecificidade na reação já que se tratava de amostras com cargas virais altas para ambos os vírus e não houve nenhuma amplificação na reação para GBV-C.

5.4.3 – Amostras

Todas as amostras de plasma foram extraídas e submetidas à síntese de cDNA. A cada corrida colocamos as amostras, a curva padrão e os controles positivo e negativo, todos em triplicata para eliminarmos grandes variações na amplificação por eventuais erros de pipetagem.

Ao final observamos que das 253 amostras, 196 foram negativas e as 57 amostras que apresentaram amplificação, também haviam sido positivas para GBV-C no PCR nested. As cargas virais de GBV-C individualizadas e os valores de CD4 e de carga viral de HIV das 57 amostras com viremia detectável no ensaio de PCR em tempo real aparecem na tabela 7, a seguir:

Tabela 7: Resultados de Carga Viral de GBV-C (N=57) e contagem de CD4 e Carga Viral de HIV

Nº Estudo	GBV-C RNA UA/mL	CD4/uL	Carga HIV cps/mL
70	13625,37	237	4.451
81	12015,04	355	81.986
157	4511,69	655	1.165
66	4477,56	333	56.116
213	4430,64	271	100
64	4318,85	235	100
151	3974,57	355	1.411
197	3899,52	332	4.738
186	2769,24	254	100
130	2336,16	314	100
230	1916,43	208	100
148	1895,83	108	100
128	1710,4	379	477
30	1638,68	410	40.763
212	1589,9	375	858

Tabela 7 (continuação): Resultados de Carga Viral de GBV-C (N=57) e contagem de CD4 e Carga Viral de HIV

Nº Estudo	GBV-C RNA UA/mL	CD4/uL	Carga HIV cps/mL
88	1467,71	284	810
172	1339,76	445	5.840
119	1221,67	487	4.604
171	1221,35	500	100
110	910,52	623	19.435
209	853,43	300	100
104	820,29	228	33.951
47	812,89	365	13.042
25	637,06	317	16.878
235	619,8	89	100
246	604,04	507	100
232	576,59	305	100
185	493,88	189	499
236	458,93	296	2.467
105	438,7	676	2.404
168	285,92	135	100
231	275,99	449	7.607
227	233,51	308	42.000
245	195,28	437	13.151
239	178,17	508	13.091
155	139,73	304	4.153
99	110,77	512	130.637
182	91,97	319	10.744
220	77,22	155	4.436
103	56,13	506	378.307
116	52,08	293	481.653
219	45,09	38	100
228	43,13	272	28.546
6	41,02	168	2267
45	38,32	57	502
62	25,16	258	111.173
263	23,43	74	942
12	23,34	175	49.347
237	16,46	443	2.720
242	16,37	293	5.971
109	9,32	108	47.420
247	9,06	219	100
114	5,88	230	46.323
205	4,63	146	29.006
20	2,81	361	3.455
15	2,79	341	22.578
254	1,1	353	920

O resumo geral dos resultados sorológicos e moleculares obtidos estão apresentados na tabela 8 abaixo.

Tabela 8: Resultados finais dos testes laboratoriais para GBV-C. α = anti-HGVenv; RNA = Viremia GBV-C.

α + / RNA +	0	0,00%
α + / RNA -	64	25,30%
α - / RNA +	57	22,53%
α - / RNA -	132	52,17%
	253	100,00%

A comparação dos resultados entre os métodos pode ser vista na tabela 9, onde podemos observar com mais clareza o resultado de cada teste e como esses valores demonstram uma maior sensibilidade e especificidade de um método comparado a outro em números, pois podemos verificar que o número de amostras positivas do PCR convencional difere dos métodos de PCR Nested e Real Time, devido aos critérios acima citados. Também podemos ver que nenhum dos métodos que avaliou a viremia quando comparado com a sorologia teve resultados positivos para ambos.

Tabela 9: Comparação dos resultados laboratoriais sorológicos e moleculares, técnica por técnica. Sorologia = anti-E2.

		PCR simples		
		pos	neg	
Sorologia	pos	0	64	Total
	neg	36	153	
		36	217	253

		PCR Tempo Real		
		pos	neg	
PCR simples	pos	36	0	Total
	neg	21	196	
		57	196	253

		PCR nest.		
		pos	neg	
Sorologia	pos	0	64	Total
	neg	57	132	
		57	196	253

		PCR nest.		
		pos	neg	
PCR simples	pos	36	0	Total
	neg	21	196	
		57	196	253

		PCR Tempo Real		
		pos	neg	
Sorologia	pos	0	64	Total
	neg	57	132	
		57	196	253

		PCR Tempo Real		
		pos	neg	
PCR nest.	pos	57	0	Total
	neg	0	196	
		57	196	253

A correlação entre as cargas virais de ambos os vírus foi ainda menor (índice Pearson = -0,09) onde o valor negativo denota correlação inversa, porém estatisticamente não-significante $p=0,2$). A tabela 10 traz os dados estatísticos das médias, medianas e desvios-padrão das amostras GBV-C-RNA positivas e negativas.

Tabela 10: Média, Mediana e Desvio-Padrão dos valores de Carga Viral HIV e Contagem de Células CD4 nos grupos GBV-C-RNA positivo e negativo.

	MÉDIA		MEDIANA		Desvio Padrão	
	Carga Viral HIV/mL	CD4/uL	Carga Viral HIV/mL	CD4/uL	Carga Viral HIV/mL	CD4/uL
GBV-C-RNA+ (N=57)	35.162,6	313,9	4.738,0	305,0	87.672,1	145,8
GBV-C-RNA- (N=196)	71.859,2	294,9	5.902,0	280,5	159.882,3	183,5

6. Discussão

Desde a década de 80 quando foi descoberto o primeiro caso de AIDS, o número de pessoas portadoras do vírus HIV aumentou de forma abrupta, elevando a AIDS a um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade. No começo a AIDS atingiu de forma intensa, os homossexuais, os usuários de drogas ilícitas endovenosas e indivíduos que receberam transfusões sanguíneas e de hemoderivados. Porém, com o passar dos anos o perfil epidemiológico vem mudando e o número de casos de portadores do vírus HIV está aumentando entre os heterossexuais, as mulheres, pessoas de baixa renda e saindo dos grandes centros para as pequenas cidades ⁷⁶.

Dados atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 30 milhões de pessoas vivam com AIDS no mundo. Segundo o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, até Junho/2008 foram identificados 506.499 casos de AIDS no Brasil, com um total de óbitos acumulados até 2007 de 205.409. O número de casos vem aumentando no país, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro- Oeste, em especial entre as mulheres ⁷⁶.

Foram identificados até Junho de 2008 um total de 333.485 casos de AIDS no sexo masculino e 172.995 no sexo feminino, observou-se também que a razão de sexo (M:F) no Brasil diminuiu bastante ao longo do tempo, passando de 15,1: 1 em 1986 para 1,5:1 em 2006 ^{76,77}.

Em 1996, o Brasil desenvolveu um projeto que dava a todos os portadores do HIV, acesso ao tratamento anti- retroviral. A partir deste ano, houve uma importante diminuição no número de óbitos destes pacientes. Dados do Ministério da Saúde informam que os coeficientes de mortalidade nos anos de 95 e 96 foram em média de 9,6 óbitos por 100 mil habitantes, sendo que em 1997 caiu para 7,6 mantendo uma diminuição gradativa a cada ano ⁷⁶.

Em 1998, dois estudos publicados simultaneamente por Toyoda e Heringlake, descreviam um melhor prognóstico para os pacientes HIV positivos co-infectados pelo GBV-C, propondo que esta interação retardava a progressão da infecção pelo HIV para AIDS e renovando ao mesmo tempo o interesse pelo vírus GBV-C ^{43,44}.

Devido ao fato de que o vírus GBV-C compartilha as mesmas vias de transmissão do HIV, é comum encontrar pacientes que apresentam esta co-infecção. A partir deste ponto, várias pesquisas foram realizadas em coortes de pacientes HIV positivos buscando uma patologia que se associasse ao GBV-C. Entretanto, os pesquisadores observaram que a presença da co-infecção GBV-C não apresentava nenhum aspecto desfavorável para os pacientes, ao contrário, esta interação estava associada a uma diminuição na mortalidade e melhores resultados clínicos, o que retardava a progressão da infecção pelo HIV para AIDS, comparado a pacientes que apresentavam apenas a infecção isolada pelo HIV ^{42, 44, 55, 58, 59, 60}.

A avaliação da associação entre variáveis quantitativas como contagem de células CD4+ e carga viral de HIV e com uma variável binária como o status GBV-C + ou -, pode demonstrar uma relação benéfica para os pacientes co-infectados ou descartar esta hipótese. Desta forma é possível que haja diferenças importantes entre um paciente com alta carga de GBV-C e outro com uma viremia baixíssima. Este esclarecimento só poderá ser averiguado com uma metodologia que permita não apenas detectar o RNA viral plasmático, mas também ser capaz de quantificá-lo com precisão. Devido a altíssima prevalência do GBV-C na população HIV, o uso de uma variável apenas qualitativa (RNA+ ou RNA-) pode não permitir a averiguação de diferenças prognósticas dentro do grupo RNA+. A determinação da carga viral de GBV-C permitirá investigações mais apuradas deste fator que modula a infecção pelo HIV e sua patogenia.

Levando em consideração todos estes aspectos, o desenvolvimento de uma técnica de PCR em tempo real será de grande importância para qualificar e quantificar amostras positivas do GBV-C em pacientes HIV positivos, acrescentando dados que possam ajudar a esclarecer os possíveis benefícios desta co-infecção em relação ao curso da doença causada pelo HIV. Um exemplo prático desta aplicação foi o trabalho de Maidana-Giret e colaboradores⁸⁷, que empregou nosso método na avaliação de uma coorte HIV+.

Observamos após a realização da sorologia que das 253 amostras, 64 foram positivas (25%) para o anticorpo anti E2 do GBV-C, o que é muito próximo do descrito por Maidana-Giret et al⁸⁷, que verificou a presença do anticorpo em 42 pacientes portadores do HIV (24%) dentro de um total de 175.

Para avaliar a presença do RNA do GBV-C nas amostras realizamos um PCR convencional, resultando em um total de 36 amostras positivas (14%) e 217 negativas (86%) e percebemos que os valores estavam abaixo dos citados na literatura para a população infectada pelo HIV. A prevalência da viremia do GBV-C nessa população é de aproximadamente 30 a 40%, somada a exposição ao anticorpo anti- E2 sobe para 40 a 50%^{10,12,58,68}. Desenvolvemos então, um PCR Nested para o GBV-C utilizando os primers publicados por Andonov e colaboradores⁷⁵, com o intuito de aumentar a sensibilidade e obtermos o número real de amostras positivas. Ao avaliarmos todas as amostras, encontramos mais 21 amostras positivas, além das 36 que já eram positivas no PCR convencional, totalizando 57 amostras positivas (22,5%). A concordância de 100% entre os resultados do nested PCR e o ensaio de Taqman aqui desenvolvido reforça a ideia que este Taqman tem uma sensibilidade analítica adequada, podendo substituir o uso do nested PCR para esta finalidade, com o benefício adicional de permitir a quantificação do RNA viral e sem enfrentar os problemas já discutidos dos métodos convencionais de PCR e especialmente, da questão de contaminação muito freqüente em metodologia nested.

Nossos resultados corroboram dados já existentes na literatura, pois não obtivemos nenhuma amostra que fosse positiva para ambas variáveis, anticorpo e o RNA do GBV-C, isto ocorre por se tratar de um anticorpo neutralizante¹⁰. O percentual de expostas ao GBV-C, produto da soma dos valores de exposição da sorologia com os da presença de RNA nas amostras, de aproximadamente 48%, também mostram um valor muito próximo ao encontrado por Maidana-Giret e colaboradores, em uma população brasileira recém-infectada pelo HIV⁸⁷. Em um total de 175 soroconvertores (HIV) o RNA do GBV-C foi detectado em 24% e o anticorpo anti-E2 em 25%, perfazendo 49%, sendo que um indivíduo apresentou concomitância dos marcadores, o que não foi verificado na população por nós estudada.

Considerando que o tempo de armazenamento de algumas amostras foi de até dez anos, isto poderia ter influenciado nas cargas virais baixas do GBV-C, já que a degradação do RNA viral é normal com o passar do tempo, mesmo armazenado em condições ideais.

Apesar da alta incidência do GBV-C nos portadores do HIV, o fato do mesmo não ser um vírus patogênico fez com que o interesse das empresas no desenvolvimento de kits comerciais se perdesse. Com isto, a importância do desenvolvimento de uma técnica que nos possibilite continuar

a estudar o GBV-C além de acrescentar dados como a carga viral deste vírus, torna-se mais eminente.

Ao medir-se a viremia por GBV-C observamos uma amplitude de 4 log₁₀ dos valores (1 – 13.625 UA/mL). O estudo realizado por Maidana-Giret e colaboradores em São Paulo, utilizando o ensaio por nós desenvolvido, obteve cargas virais do GBV-C entre (1 – 223.000 UA/mL) em uma população HIV+ recém-infectada⁸⁷. Outro estudo que também avaliou a carga viral de GBV-C em portadores do HIV⁶⁰ encontrou valores entre 67.000 cópias/mL e 143.000.000 cópias/mL, portanto da mesma magnitude de amplitude por nós verificada (4 log₁₀). O estudo de Souza e colaboradores empregou um método de PCR em tempo-real baseado na região 5'UTR para quantificar o GBV-C RNA, encontrando valores entre 2.3 x 10³ a 6.5 x10⁸ GE/mL. Convém ressaltar que a ausência de um padrão universal de GBV-C -RNA impede a comparação direta de valores lembrando, que nosso ensaio utilizou como calibrador uma bolsa de plasma padrão, à qual atribuímos a carga viral de 10.000 UA/mL (unidades aleatórias por mL). Se uma unidade aleatória = 1 cópia, teremos valores absolutos muito parecidos com os do estudo de Tillman e cols⁶⁰, ou seja, de 10.000 a 136.250.000).

Utilizando o ensaio de tempo real obtivemos das 253 amostras de plasma de mulheres HIV positivas uma prevalência do GBV-C -RNA de 22,5%. Esta prevalência é semelhante à da maioria dos estudos com diferentes populações HIV+ como hemofílicos japoneses⁴³ (27%) população HIV+ em geral dos EUA, majoritariamente masculina e homossexual⁵⁸ (39,8%,) ou população semelhante alemã⁶⁰(16,8%). A metanálise de Zhang e cols.⁸⁴ traz um panorama global destes dados mostrando resultados entre 16,8 e 42%. Esta metanálise incluiu onze estudos sobre o efeito da co-infecção HIV/GBV-C. A conclusão é que há um efeito “protetor” e este se torna mais evidente nas fases mais avançadas da doença por HIV/Aids. O *hazard ratio* combinado de todos estes estudos é de 0.39 ou seja, uma redução na mortalidade de cerca de 60% nos co-infectados em comparação àqueles virgens de infecção pelo GBV-C e dos anticorpo anti-E2 positivos. Deve-se acrescentar que este papel protetor ou de melhor prognóstico, do GBV-C -RNA, permanece significativo mesmo em análises multivariadas que incluem os principais fatores que poderiam levar ao erro tais como contagem inicial de CD4 e carga viral de HIV positiva, idade, terapêutica anti-retroviral.

No Brasil a prevalência encontrada por Souza e cols.⁸⁵ foi de 24% também em uma população majoritariamente masculina (90%) e homossexual. Estes valores são bastante superiores

aos descritos para a população de doadores de sangue brasileiros^{86, 30} (aproximadamente 10%). Por tratar-se de um vírus com eficiente transmissão sexual, é plausível que esta maior prevalência na população HIV+ esteja relacionada à atividade sexual desprotegida.

7. Conclusões

- A prevalência de viremia por GBV-C nesta população foi de 22,5% enquanto a de anticorpo anti-E2 de 25,3%, perfazendo uma frequência de exposição ao GBV-C de 47,8%.
- O método de determinação da carga viral de GBV-C desenvolvido é prático, sensível e reprodutível. A carga viral de GBV-C apresentou uma amplitude de cerca de 4 log₁₀, inferior à observada em outros vírus como HBV, HCV e HIV.
- Não houve correlação entre a carga viral de GBV-C e as contagens de CD4 e carga viral de HIV observadas na mesma amostra.

8. Referências

1. Deinhardt F.; Holmes AW Capps R.B.; Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages and description of liver lesions. *J Exp Med*, 125:673-688, 1967.
2. Holmes A.W.; Deinhardt F.; Wolfe L.; Froesner G.; Peterson D.; Casto B.; Conrad M.E. Specific neutralization of human hepatitis type A in marmoset monkeys. *Nature*, 243(5407):419-20, 1973.
3. Simmons J.N.; Pilot- Matias T.J.; Leary T.P. et al. identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Nat Acad Sci USA*, 92:3401-3405, 1995.
4. Simmons J.N.; Leary T.P.; Dawson G.J.; Pilot-Matias A.S; Muerhoff A.S. et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*, 1:564-569, 1995.
5. Linnen J.; Wages J.; Zhang-keck Z-Y. et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271:505-508, 1996.
6. Muerhoff A.S.; Simons J.N.; Leary T.P.; Erker J.C.; Chalmers M.L.; Pilot-Matias A.S. et al. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J of Hepatology*, 25:379-384, 1996.
7. Linnen J.; Fung K.; Fry K.E.; Mizokami M.; Ohba K.; Wages J.M.; Zhang-Keck Z.Y. et al. Sequence variation of phylogenetic analysis of the 5' terminus of hepatitis G virus. *J Virol Hepat*, 4(5):293-302, 1997.
8. Lim M.Y.; Fry K.; Yun A.; Chong S.; Linnen J.; Fung K.; Kim J.P. Sequence variation of phylogenetic analysis of envelope glycoprotein of hepatitis G virus. *J Gen Virol*, 78(11):2771-2777, 1997.
9. Leary T.P.; Muerhoff A.S.; Simons J.N. et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the flaviviridae associated whit human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*, 48:60-67, 1996.
10. Stapleton J.T. GB virus type C/ hepatitis G virus. *Sem Liver Dis*, 23(2)137-148, 2003.
11. Thomas D.L.; Vlahov D.; Alter H.J. et al. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis*, 177:539-542, 1998.
12. Gutierrez R.A.; Dawson G.J.; Knigge M.F. et al. Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J Med Virol*, 53:167-173, 1997.
13. Feucht H.H.; Zollner B.; Polywka S. et al. Distribution of hepatitis G viremia and antibody response to recombinant proteins with special regard to risk factors in 709 patients. *Hepatology*, 26:491-494, 1997.

14. Polgreen P.M.; Xiang J.; Chang Q.; Stapleton J.T. GB virus type C/ Hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV- infected individuals. *Micro Infect*, 5:1255-1261, 2003.
15. Rendina D.; Vigorita E.; Laccetti P.; Portella G. et al. HCV and GBV-C/ HGV infection in HIV positive patients in Southern Italy. *Eur J Epidemiol*, 17:801-807, 2001.
16. Simons J.N.; Desai S.M.; Mushahwar I.K. The GB viruses. *Curr Trop Microbiol Immunol*, 242:341-375, 2000.
17. Xiang J.; Klinzman D.; McInden J. et al. Characterization of hepatitis G virus C (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol*, 72:2738-3744, 1998.
18. Tucker T.J.; Smuts H.E.; Eedes C.; Knobel G.D. et al. Evidence that the GBV-C/ hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol*, 61(1):52-58, 2000.
19. Smith D.B.; Simmonds P.; Frost S. et al. Phylogenetic analysis of GBV-C/ hepatitis G virus. *J Gen Virol*, 81:769-780, 2000.
20. Pavesi A. Origin and evolution of GBV-C/ hepatitis G virus and relationships with ancient human migrations. *J mol Evolu*, 53(2):104-113, 2001.
21. Tucker T.J.; Smuts H.E. GBV-C/ HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. *J Med Virol*, 62(1):82-83, 2000.
22. Oliveira L.A.; Martins R.M.; Carneiro M.A. et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/ hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7):953-957, 2002.
23. Nishia A.S.; Ribeiro-dos-Santos G.; Bassit L. et al. Genotype distribution of the GB virus C in citizens of São Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 45(4):213-216, 2003.
24. Feucht H.H.; Zollner B.; Polywka S.; Knodler B. et al. Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *J Clin Microbiol*, 35:767-768, 1997.
25. Halasz R.; Weiland O.; Sallberg M. GB virus C/ hepatitis G virus. *Scand J Infect Dis*, 33: 572-580, 2001.
26. Abe K. GB virus C/ hepatitis G virus. *Jpn J Infect Dis*, 54(2): 55-63, 2001.
27. Xiang J.; Wunschmann S.; Schmidt W.N.; Shao J.; Stapleton J.T. Full-length GB virus C (hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4- positive T cells. *J Virol*, 74: 9125-9133, 2000.

28. Bassit L.; Kleter B.; Ribeiro-dos-Santos G.; Maertens G.; Sabino E. et al. Hepatitis G virus: prevalence and sequence analysis in blood donors of São Paulo, Brazil. *Vox Sang*, 74: 83-87, 1998.
29. Ribeiro-dos-Santos G.; Nishia A.S.; Nascimento C.M.; Bassit L. et al. Prevalence of GB vírus C (hepatitis G vírus) and risk factors for infection in São Paulo, Brazil. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*, 21(6): 438-443, 2002.
30. Levi J.E.; Contri D.G.; Lima L.P.; Takaoka D.T. et al. High prevalence of GB virus C/ hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 45(2): 75-78, 2003.
31. Alter HJ. G-pers creepers, where'd you get those papers? A reassessment of the literature on the hepatitis G virus. *Transfusion*, 37: 569-572, 1997.
32. Fried M.W.; Khudyakov Y.E.; Swallow G.A. et al. Hepatitis G virus co-infection in liver transplant recipients with chronic hepatitis C and non-viral chronic liver disease. *Hepatology*, 25:1271-1275, 1997.
33. Kuroki T.; Nishiguchi S.; Tanaka M.; Enomoto M.; Kobayashi K. Does GBV-C cause fulminant hepatitis in Japan? *Lancet*, 347: 908, 1996.
34. Sallie R.; Shaw J.; Mutimer D. GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *Lancet*, 347: 1552, 1996.
35. Kanda T.; Yokosuka O.; Ehata T. et al. Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse transcription polymerase chain reaction. *Hepatology*, 25:1261-1265, 1997.
36. Hassoba H.M.; Pessoa M.G.; Terrault N.A. et al. Anti-envelope antibodies are protective against GBV-C reinfection: evidence from the liver transplant model. *J Med Virol*, 56:253-258, 1998.
37. Dickens T.; Lemon S.M. GB virus C, hepatitis G virus or human orphan flavivirus? *Hepatology*, 25:1285-1286, 1997.
38. Tillmann H.L.; Heringlake S.; Trauwein C. et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C of the new infection. *Hepatology*, 28:379-384, 1998.
39. Pessoa M.G.; Terrault N.A.; Ferrell L.D. et al. Hepatitis G virus in patients with cryptogenic liver disease undergoing liver transplantation. *Hepatology*, 25:1266-1270, 1997.
40. Van der Bij A.K.; Kloosterboer N.; Prins M. et al. GB virus C co-infection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis*, 191:678-685, 2005.
41. Muerhoff A.S.; Tillmann H.L.; Manns M.P.; Dawson G.J.; Desai S.M.; GB virus C genotype determination in GB virus C/ HIV co-infected individuals. *J Med virol*, 70:141-149, 2003.

42. Sabin C.A.; Devereux H.; Kinson Z. et al. Effect of co-infection with hepatitis G virus on HIV disease progression in hemophilic men . *J Acquir Immune defec Syndr*, 19: 546-547, 1998.
43. Toyoda H.; Fukuda Y.; Hayakawa T.; Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus co-infection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune defec Syndr*, 17: 209-213, 1998.
44. Heringlake S.; Ockenga J.; Tillman H.L.; Trautwein C.; Meissner D. et al. GB virus C/hepatitis G infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis*, 177:1723-1726, 1998.
45. Goodnough L.T.; Brecher M.E.; Kanter M.H.; Aubuchon J.P. medical progress: Transfusion medicine (First of two parts) – blood Transfusion. *N Engl J Med*, 340(6):438-447, 1999.
46. Cheng P.N.; Jen C.M.; Young K.C.; Chen C.Y. et al. High- dose interferon-alpha 2b plus ribavirin combination therapy for GB virus C. A study in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 50(5): 449-452, 2003.
47. Yu M.L.; Chuang W.L.; Dai C.Y; Chen S.C.; Lin Z.Y. et al. GB virus C/ hepatitis G virus infection in chronic hepatitis C patients with and without interferon-alpha therapy. *Antiviral Res*, 52(3):241-249, 2001.
48. Fujisawa T.; Horiike N.; Michitaka K.; Onji M. Influence of RNA titre and amino acid changes in the NS5A region of GB virus C/ hepatitis G virus on the effectiveness of interferon therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 15(6):632-639, 2000.
49. Fauci A.S.; Rosenberg Z.F. Immunopathogenesis. In: Broder S, Merigan Jr C, Bolognesi D. *Textbook of AIDS Medicine*. Williams & Wilkins; USA- Mariland, 1994.
50. Rosenberg Z.F.; Fauci A.S. The Immunopathogenesis of HIV infection. *Adv Immunol*, 47: 377-431, 1989.
51. Johnson F.L.; Rubin C.M. Allogenic marrow transplantation in the treatment of infants with cancer. *Br J Cancer (suppl)*, 18:576-579, 1992.
52. Salk P.L.; Salk J. Cell mediated immunologic memory in prevention and treatment of HIV disease. *Res Immunol*, 145: 629-635, 1994.
53. Stanley S.K.; Fauci A.S. Immunology of AIDS HIV infection. In: Mandell, Douglas and Bannet`s. *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstones, 4:1203-1216, 1995.
54. Fauci A.S.; Lane HC. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Harrison`s principles of internal medicine*, 12: 1402-1410, 1991.
55. Lefrère J.J.; Roudot-Thoraval F.; Morand-Joubert L.; Petit J.C.; Lerable J. et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical

- progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis*, 179: 783-789, 1999.
56. Yeo A.E.T.; Matsumoto A.; Hisada M. et al. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. *Ann Intern Med*, 132:959-963, 2000.
 57. Nunnari G.; Nigro L.; Palermo F. et al. Slower progression of HIV-1 infection in HGV/ GB virus C co-infected individuals correlates with an intact T helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med*, 139(1): 26-30, 2003.
 58. Xiang J.; Wünschmann S.; Diekema D.J.; Klinzman D.; Patrick K.D. et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Eng J Med*, 345: 707-714, 2001.
 59. Tillmann H.L.; Heiken H.; Knapik-Botor A.; Heringlake S.; Ockenga J. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Eng J Med*, 345: 715-724, 2001.
 60. Souza I.E.; Zhang W.; Diaz R.S.; Chaloner K.; Klinzman D.; Stapleton J.T. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med*, 7(1): 25-31, 2006.
 61. Rodriguez B.; Woolley I.; Lederman M.M.; Zdunek D.; Hess G. et al. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*, 187(3): 504-507, 2003.
 62. Williams C.F.; Klinzman D.; Yamashita T.E.; Xiang J.; Polgreen P.M. et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Eng J Med*, 350(10): 981-990, 2004.
 63. Natterman J.; Nischalke H.D.; Kupfer B.; Rockstroh J.; Hess L. et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS*, 17: 1457-1462, 2003.
 64. Brandt S.M.; Mariani R.; Holland A.U. et al. Association of Chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor downmodulation. *Virology*, 234: 340-348, 1997.
 65. Alkhatibe G.; Locati M.; Kennedy P.E. et al. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology*, 234:340-348, 1997.
 66. Xiang J.; George S.L.; Wünschmann S.; Chang Q.; Klinzman D. et al. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , and SDF-1. *Lancet*, 363: 2040-2046, 2004.
 67. Bollinger R.C; Gupta A. GB virus type C: A virus in search of a disease or a role in HIV therapy? *Clin Infect Dis*, 38: 410-411, 2004.
 68. Rey D.; Vidinio- Moularde J.; Meyer P.; Schmitt C.; Fritsch S.; Lang J.M.; Stoll-Keller F. High prevalence of GB virus C/ hepatitis G virus RNA and antibodies in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*, 19(9):721-724, 2000.

69. Saiki R.; Scharf S.; Faloona F.; Mullins K.; Horn C.; Erlich H.; Arnheim N. Amplificação enzimática das seqüências genômicas da β globina e análises do sítio de restrição das células da anemia falciforme. *Science*, 230:1350-154, 1985.
70. Higuchi R.; Dollinger G.; Walsh P.S.; Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413-417, 1992.
71. Higuchi R.; Fockler C.; Dollinger G.; Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026-1030, 1993.
72. Holland P.M.; Abramson R.D.; Watson R.; Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of thermophilic DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 7276-7280, 1991.
73. Lee L.G.; Connell C.R.; Bloch W. Allelic discrimination by nick- translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*, 21: 3761-3766, 1993.
74. Levi JE.; Fernandes S.; Tateno A.F.; Motta E.; Lima L.P.; Eluf-Neto J.; Pannuti C.S. Presence of Multiple Human Papillomavirus Types In Cervical Samples From Hiv-Infected Women. *Gynecol Oncol*, 92(1): 226-232, 2004.
75. Andonov A.; Sauder C.; Jacobsen H.; Chaudhary R. Comparison of six sets of PCR primers from two different genomic regions for amplification of GB virus C/Hepatitis G virus RNA. *J Clin Microbiol*, 36:286-289, 1998.
76. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico – AIDS. Ano V nº 01 – 27ª a 52ª semanas epidemiológicas – Janeiro a Junho de 2008.
77. Birk M.; Lindback S.; Lidman C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS*, 16: 2482-2485, 2002.
78. Brume Z.L.; Chan K.J.; Dong W.W.Y. et al. No association between GB virus C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS*, 16:1929-1933, 2002.
79. Hattori J.; Okumura N.; Yamazaki Y.; Uchiyama M.; Hamaguchi M. et al. Beneficial effect of GB virus C co-infection in human immunodeficiency virus type-1 infected individuals. *Microbiol Immunol*, 51:193-200, 2007.
80. Hattori J.; Ibe S.; Nagai H.; Wada K.; Morishita T.; Sato K. et al. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual Men. *Microbiol Immunol*, 47:759-763, 2003.
81. Sauleda S.; Reesink H.J.; Esteban J.I.; Hess G.; Esteban R.; Guardia J. Profiles of GBV- C/ Hepatitis G virus markers in patients coinfecting with hepatitis C virus. *J Med Virol*, 59:45-51, 1999.

82. Livak K.J.; Flood S.J.A.; Marmaro J.; Giusti W.; Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite end provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4: 357-362, 1995.
83. Schwarse- Zander C.; Blackard J.T.; Zheng H.; Addo M.M. et al. GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/ HIV – coinfecting patients receiving HCV treatment: Importance of GBV- C genotype. *J Infect Dis*, 194:410-419, 2001.
84. Zhang W.; Chaloner K.; Tillmann H.L.; Williams C.F.; Stapleton J.T. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Medicine* 7: 173-180, 2006.
85. Souza I.E.; Allen J. B.; Xiang J.; Klinzman D.; Diaz R.; Zhang S.; Chaloner K.; Zdunek D.; Hess G.; Williams C.F.; Benning L.; Stapleton J.T. Effect of Primer Selection on Estimates of GB Virus C (GBV-C) Prevalence and Response to Antiretroviral Therapy for Optimal Testing for GBV-C Viremia. . *J Clin Microbiol*, 44(9): 3105-3113, 2006.
86. Levi J.E. ; Contri D.G. ; Lima L.P. ; Takaoka D.T ; Garrini R.H. et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 45:75-78, 2003.
87. Maidana-Giret M.T.; Silva T.M.; Sauer M.M.; Tomiyama H.; Levi J.E. et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS*, 23:2277-87, 2009.