

Estudio comparativo entre dos técnicas comerciales para la cuantificación de carga viral plasmática en pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1.

Comparative study of two commercial technical for quantification of viral load in patients infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1.

Jesús D Ramírez O¹, Elsy A Gudiño S¹, Marwan S Aguilar¹, Pierina D'Angelo S¹, Héctor Ariza J ¹, Carmen DV Reyes ¹, Cristina DR Gutiérrez ².

Laboratorio Programas Especiales (Hepatitis y Sida), Departamento de Virología, Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela.

²Escuela de Bioanálisis-Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela

Jesús D. Ramírez Orduz. Dirección: Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y SIDA), Departamento de Virología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela. Telf.: 58-212-2191703. Correo electrónico: jesús.ramirez@inhrr.gob.ve.

RESUMEN

Los ensayos de cuantificación de ARN plasmáticos de VIH-1 son importantes para el control de pacientes infectados, así como el monitoreo de la respuesta a la terapia antirretroviral. Por lo tanto, los ensayos comerciales empleados para este propósito deben presentar buena correlación entre sí, para dar lugar al manejo terapéutico apropiado. El objetivo del estudio consistió en correlacionar los resultados obtenidos mediante el ensayo de amplificación de señal (bDNA) y PCR en tiempo real (RT-PCR), ambas casas comerciales aprobadas por la FDA y con diferente diana de detección del VIH-1. La validación se realizó con 180 muestras clínicas de pacientes referidos al INHRR. Los resultados fueron comparados con la subpoblación de linfocitos TCD4⁺ determinados mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó empleando el coeficiente de regresión lineal de Pearson (R^2) y el valor de contraste de hipótesis con una significancia del 95 %, usando el programa SPSS Statistics v10.0. Se observó una buena correlación entre los ensayos ($R^2=0.961$, $p<0.05$), siendo la RTPCR más sensible. Las diferencias cuantitativas de carga viral entre las técnicas ensayadas fue menor de 0.5 log₁₀ copias/ml para el 89% de las muestras, y >1 log₁₀ copias/ml solo en dos pacientes, no indicando necesariamente cambio terapéutico. Adicionalmente, se encontró una correlación inversa entre los linfocitos TCD4⁺ y carga viral del VIH-1 medida por bDNA ($R^2= 0.20$, $p<0.05$) y RT-PCR ($R^2= 0.15$, $p<0.05$). Los ensayos evaluados mostraron que ambas técnicas pueden ser empleadas indistintamente para el control de los pacientes VIH positivo.

Palabras clave: VIH-1, carga viral, CD4⁺, bDNA, PCR tiempo real.

ABSTRACT

The assay for quantification of plasma HIV-1 RNA are important for the control of patients infected, as well as the monitoring of the response to antiretroviral therapy. Therefore, the commercial assays used for this purpose must submit good correlation between to give place to the appropriate therapeutic management. In this study, we correlate the results obtained through the testing of signal amplification (bDNA) and real-time PCR (RT-PCR), two comercial technical approved by the FDA and with different targets of detection HIV-1. The validation was carried out with 180 clinical samples of patients referred to the INHRR. The results were compared with the subpopulation of lymphocytes TCD4⁺ determined by flow cytometry. The statistical analysis was performed using the program SPSS Statistics v10. It was observed good correlation between the tests studied ($R^2=0.961$, $p<0.05$), with RT-PCR more sensitive. The quantitative differences in viral load between the techniques tested was less than 0.5 log₁₀ copies/ml for the 89% of the samples, and >1 log₁₀ copies/ml in only two patients. Additionally, it was found an inverse correlation between lymphocytes TCD4⁺ and viral load of HIV-1, measured by bDNA ($R^2= 0.20$, $p<0.05$) and RT-PCR ($R^2= 0.15$, $p<0.05$). Therefore, these assays can be employed for the patient control HIV.

INTRODUCCIÓN

La valoración cuantitativa en plasma del ARN del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), es esencial para el manejo de los pacientes infectados, al ser indicador directo del proceso de replicación viral, marcador pronóstico de progresión de la enfermedad, ayuda a evaluar la eficacia virológica del tratamiento antirretroviral y a definir el fracaso virológico. Adicionalmente, los niveles plasmáticos del virus se correlacionan con el deterioro inmunológico del paciente al ser el linfocito TCD4⁺ la célula diana del VIH⁽¹⁻⁴⁾. Más aún, con el advenimiento de la terapia antirretroviral de alta eficacia, este ensayo ha sido considerado de gran utilidad para detectar tempranamente aquellos casos que pudieran ser factibles de un fallo al tratamiento instaurado y ser empleado como guía en las decisiones terapéuticas^(5, 6).

En la actualidad, existe gran variedad de ensayos para la cuantificación de carga viral plasmática en pacientes infectados con VIH-1. Estas presentan diferencias en su rango dinámico de cuantificación, diana de detección del virus, volumen y

preparación de la muestra, así como en el fundamento de la técnica. Por lo tanto, puede traer diferencias clínicamente significativas en el valor de la carga viral, representado un efecto negativo en el abordaje del paciente. Múltiples estudios han demostrado diferencias significativas en los ensayos de punto final con respecto a los de tiempo real, con mayor relevancia en el límite inferior de cuantificación, debido a la mayor sensibilidad de los ensayos de tiempo real^(7, 8). Por lo tanto, es crítico brindar mediciones lo más precisas posibles de carga viral al paciente VIH, para poder determinar el pronóstico de la enfermedad y guiar el curso del tratamiento. La falta de precisión en la cuantificación del virus puede conducir a la gestión clínica inadecuada de los pacientes, desde la decisión de instaurar innecesariamente una terapia antirretroviral, cambios en el esquema de tratamiento, así como también estudios adicionales de resistencia antirretroviral. También pueden llevar a inferir erróneamente problemas de adherencia a un régimen terapéutico o conducir a conclusiones erróneas. Por lo tanto, debe prestarse especial atención a la sensibilidad, reproducibilidad y bajos coeficientes de variación en las determinaciones de carga viral^(9, 10).

El presente estudio tiene como propósito comparar los resultados de carga viral obtenidos por dos técnicas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*), Versant 340 v.3.0 (bDNA) y RT-PCR COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan48 v.2.0 (CAP/CTM), en plasmas de pacientes infectados por VIH-1, a fin de evaluar si estos ensayos pueden ser utilizados indistintamente en el monitoreo de un grupo de pacientes en Venezuela o por el contrario el cambio de un método a otro para la evaluación de una misma población podría afectar la interpretación de los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población evaluada.

Un total de 180 muestras de pacientes infectados por VIH-1, fueron colectadas de manera aleatoria en el periodo septiembre-noviembre 2012, para la determinación de carga viral. Los pacientes evaluados presentaban diagnóstico previo de VIH mediante pruebas serológicas y confirmado por ensayos de “Western Blot”.

Recolección y procesamiento de las muestras para determinación de la carga viral del VIH-1.

Previo consentimiento informado, se tomaron muestras sanguíneas por punción venosa en tubos con EDTA al 10%, para la cuantificación del ARN del VIH y para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias TCD4⁺/TCD8⁺. Las muestras para carga viral se sometieron a centrifugación (14.000 rpm) por 10 minutos dentro de las 2 horas de recolección, seguidamente los plasmas se almacenaron a -70°C. Todas las muestras se recolectaron y analizaron en el Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y SIDA) del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR).

La cuantificación del ARN del VIH de estas muestras, se realizó mediante dos métodos comerciales, de acuerdo a las especificaciones de cada técnica. Los niveles plasmáticos del VIH-1 fueron determinados en copias/ml en ambas metodologías.

(i) bDNA v3. VERSANT HIV-1 branched DNA versión 3.0® (Siemens). La extracción del ácido nucleico se realizó manualmente. Su diana de detección se encuentra en el gen *pol* del VIH-1, el rango dinámico de cuantificación del ensayo es de 50 a 500.000 copias de ARN/ml, emplea 1 ml de plasma. El fundamento de la técnica se basa en la amplificación de una señal ⁽¹¹⁾. El virus es lisado, liberándose su ARN, donde oligonucleótidos sintéticos o sondas (blanco) median la captura del ARN viral a la superficie de un micropozo en una placa de poliestireno. Otras sondas específicas (preamplificadora y amplificadora) a su vez permiten la unión del ARN viral a moléculas de ADN ramificadas con múltiples copias de fosfatasa alcalina. Posteriormente, se incuba el complejo con un sustrato quimioluminiscente (dioxietano) y se mide la emisión de luz con un luminómetro. La señal de quimioluminiscencia obtenida es directamente proporcional a la concentración de ácido nucleico presente en la muestra. El ensayo fue realizado, usando el sistema 340 bDNA Quantiplex automatizado ⁽¹²⁾.

(ii) CAP/CTM v2.0. PCR en tiempo real COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan48® HIV-1 Test v.2.0 (Roche). La extracción del material genético fue automatizada. La diana de detección se localiza en el gen *gag* y en la región *LTR* del VIH-1. Presenta un rango dinámico de detección de carga viral entre 20 a 10.000.000 copias de ARN/ml, utiliza 1.2 ml de plasma. El ensayo se fundamenta en la determinación de la carga viral en base a la amplificación de una secuencia genética del VIH-1 combinado con un sistema de detección reacción en cadena de

la polimerasa en tiempo real⁽¹³⁾. La transcripción reversa, amplificación y detección de los niveles de ARN viral fueron realizadas en un analizador COBAS TaqMan 48.

Cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias TCD4+/TCD8+. Se analizaron 180 muestras de sangre completa provenientes de la población evaluada. La determinación de linfocitos se realizó mediante Citometría de Flujo por el Sistema FacsCount, Becton Dickinson, de acuerdo a las instrucciones de la técnica. Los resultados fueron expresados en valores absolutos de células/mm³.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Los niveles obtenidos de carga viral por ambos ensayos expresados en copias de ARN/ml, fueron transformados en logaritmo de base 10 (\log_{10}) para el estudio de su comparación. Estas variables cuantitativas se expusieron en medias; y se determinó la concordancia entre las técnicas, categorizando el número de copias según dos puntos de cortes críticos para la toma de decisiones clínicas (menor de 50 copias/ml y mayor a 500.000 copias/ml), considerando de manera arbitraria los límites de la técnica bDNA v3, debido a que posee el menor rango dinámico de detección. Se correlacionaron los resultados de carga viral medida por ambos métodos, empleando el coeficiente de regresión lineal de Pearson (R^2) y el valor de contraste de hipótesis (p). El análisis estadístico fue realizado, utilizando el programa computarizado SPSS Statistics v10.0.

RESULTADOS

La media de la carga viral fue de 2,269 \log_{10} copias/ml y 2,411 \log_{10} copias/ml en la población estudiada mediante los ensayos bDNA y CAP/CTM, respectivamente. Los valores de carga viral obtenidos por CAP/CTM eran más elevados en comparación con bDNA, la frecuencia con que la diferencia de carga viral superó los 0,5 \log copias/ml entre ambas técnicas fue de 11,11% (20/180 muestras). La tabla 1 muestra el número de casos concordantes y discordantes para cada categoría de carga viral entre CAP/CTM y bDNA.

Tabla 1. Concordancia y discordancia de bDNA y CAP/CTM para dos categorías de importancia clínica. Los contenidos de cada casilla se expresan en valores absolutos (número total de observaciones con cada técnica=180)

		CAP/CTM copias/ml	
		50-500.000	>500.000
bDNA copias/ml	50-500.000	159	19
	>500.000	1	1

En general, se obtuvo buena concordancia entre las pruebas ($\kappa=0,90$), con una correlación estadísticamente significativa ($r_p=0,98$, $R^2=0,96$, $p < 0,05$. Figura 1). La diferencia promedio entre el \log_{10} copias/ml de la carga viral según CAP/CTM y bDNA, fue de $0,14 \pm 0,01 \log_{10}$.

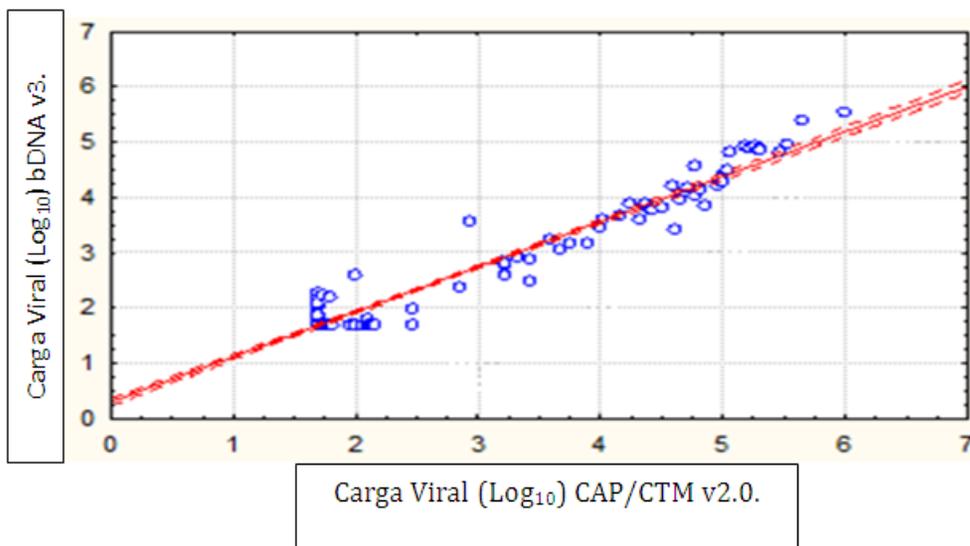


Figura 1. Correlación entre logaritmos de carga viral (\log_{10} copias/ml) con técnica bDNA v3 y CAP/CTM v2.0.

La media del recuento de linfocitos TCD4⁺ fue de 499 cél/mm³, obteniendo una correlación inversa entre cuantificación de linfocitos TCD4⁺ y carga viral del VIH determinada mediante bDNA ($r_p=-0,44$, $R^2=0,20$, valor de $p<0,05$) y CAP/CTM ($r_p=-0,38$, $R^2= 0,15$, valor de $p<0,05$), respectivamente. Por lo general, se demostró una mayor carga viral en aquellos casos que presentaban recuentos bajos de linfocitos TCD4⁺ y una menor carga viral en aquellos con recuentos de CD4⁺ más elevados (Figuras 2 y 3).

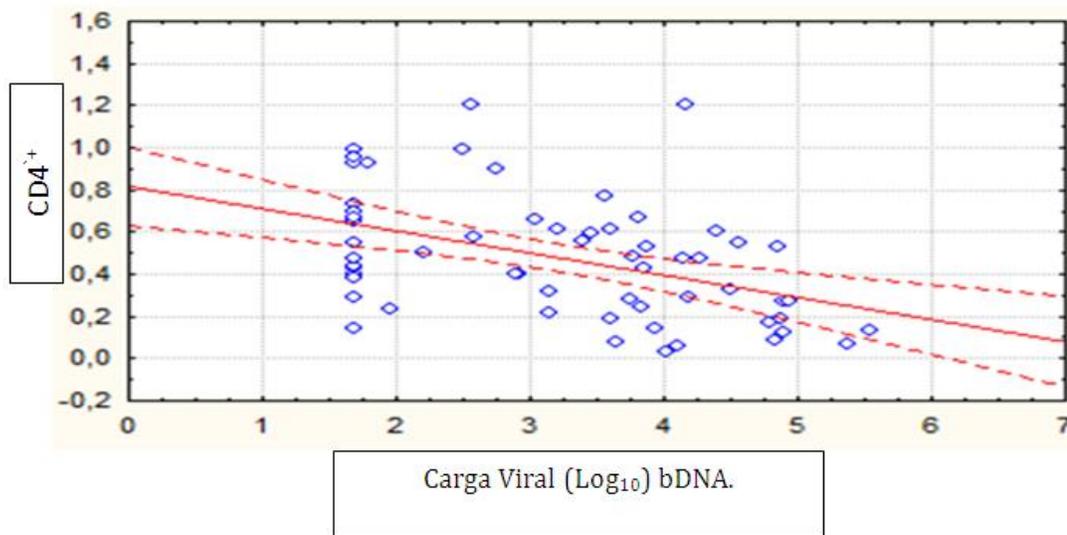


Figura 2. Correlación entre recuento de linfocitos TCD4⁺ (cél/mm³) y logaritmos de carga viral (log₁₀ copias/ml) con la técnica bDNA.

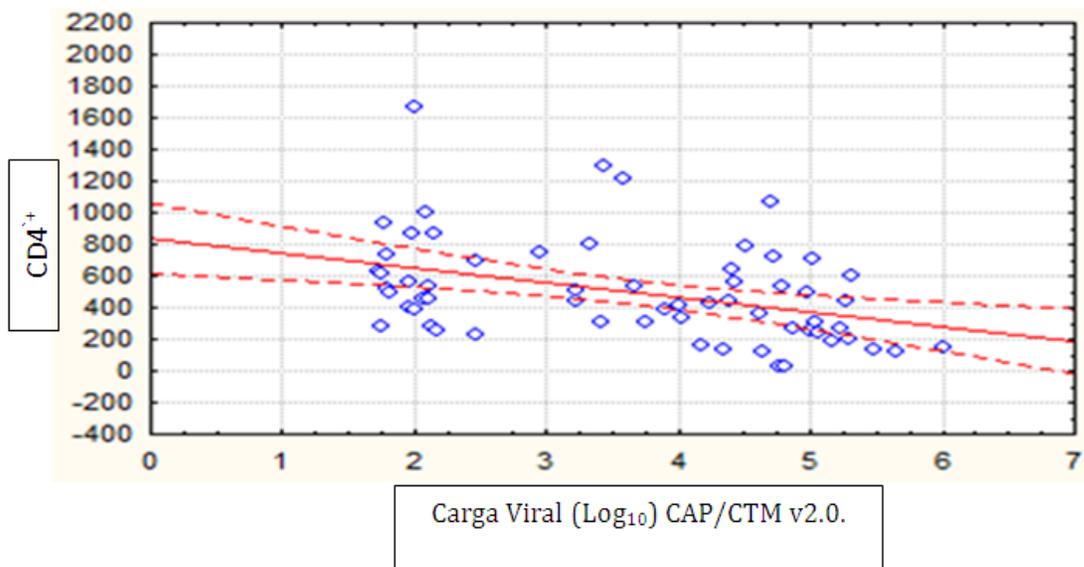


Figura 3. Correlación entre recuento de linfocitos TCD4⁺ (cél/mm³) y logaritmos de carga viral (log₁₀ copias/ml) con la técnica CAP/CTM.

DISCUSIÓN

La carga viral y el conteo de las células TCD4⁺ son dos marcadores empleados para monitorear los niveles de viremia y la función inmune de los pacientes infectados por VIH. La carga viral al expresar el número de partículas virales circulantes a nivel sanguíneo, permite una mayor información sobre la dinámica del virus en el organismo en cuanto al estado de la infección, riesgo de progresión y efectividad del tratamiento ⁽¹⁴⁾.

Los resultados obtenidos mostraron excelente concordancia estadística, con valor de kappa no ponderado por encima de 0,90 y niveles de correlación de Pearson entre técnicas bDNA y CAP/CTM (R^2 mayor de 0,95), lo cual significa que la variabilidad intrínseca de ambas técnicas es muy similar entre sí para la mayoría de los casos. Coeficientes de correlación (R^2) en un rango de 0.950 a 0.970 han sido reportados por otros autores ^(12,15-18). Adicionalmente, estas variables estadísticas reflejan que la sensibilidad es similar para ambas técnicas, por tanto

estas metodologías pueden ser intercambiables en la medida de la progresión de la carga viral de un paciente infectado con VIH-1.

El seguimiento de la respuesta a la terapia antirretroviral se basa en las mediciones de ARN del VIH-1, con el objetivo de lograr la supresión virológica, definida como un nivel por debajo del límite de detección de la prueba. A medida que los ensayos se han vuelto más sensibles, la frecuencia del ARN detectable del VIH-1 a niveles bajos se ha vuelto muy común⁽¹⁹⁾, esto trae como consecuencia, un incremento en la aparición de ARN viral detectable transitorio “*blips virales*”. En este trabajo, se encontraron solo 10 pacientes (datos no mostrados) con carga viral indetectable (<50 copias/ml) por la metodología bDNA y detectable (20 – 49 copias/ml) por CAP/CTM, estos resultados deben ser interpretados cuidadosamente, debido a que el VIH es suprimido durante la terapia y la detección de bajos niveles de ARN viral es predictor de un control virológico subóptimo, que puede no conducir a un fallo virológico o requerir de un cambio en el esquema de tratamiento. Por lo tanto, el impacto de estas detecciones requerirá de la evaluación de nuevos estudios clínicos⁽²⁰⁾.

Otros estudios también han demostrado como los ensayos en tiempo real muestran mayor valor de carga viral en comparación con los de punto final⁽²¹⁾. En un número importante de casos (20/180 muestras) se observó que la diferencia del logaritmo de la carga viral de una técnica a otra fue superior a 0,5 logaritmo, esto podría explicarse por la alta sensibilidad demostrada en las técnicas de PCR en tiempo real, gracias a su sistema de amplificación que utiliza múltiples blancos de detección^(22, 23). Sin embargo, el 11,11% de subestimación de los niveles de carga viral hallados en nuestro estudio, no indica directamente la necesidad de un cambio en el esquema del tratamiento, debido a que la evolución viral del paciente se debe analizar considerando los niveles plasmáticos de ARN del VIH junto al recuento de linfocitos TCD4⁺. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que aunque ambas metodologías tengan excelente correlación, las decisiones clínicas pueden verse afectadas con frecuencia si las técnicas se intercambian de manera indistinta, en pacientes que manejan valores de carga viral elevadas, no así en pacientes con carga viral baja o indetectable.

Otro punto a considerar en las pruebas de detección de carga viral VIH-1 es la variabilidad biológica (variabilidad aleatoria a corto plazo dentro del sujeto), que en general contribuye hasta $\pm 0,3 \log_{10}$ (copias/mL) a la variabilidad en los resultados; y la variabilidad de la prueba (variabilidad independiente de la muestra)

típicamente contribuye hasta $\pm 0.2 \log_{10}$ (copias / mL) cuando se evalúa de forma independiente ^(18, 24). Por tanto, es probable encontrar resultados que muestren una variabilidad menor o igual a $0,5 \log_{10}$. Adicionalmente, existen otras fuentes de error que pueden explicar los resultados discrepantes. La congelación de los tubos, la velocidad de centrifugación inadecuada durante el procesamiento de las muestras para la técnica de bDNA y la centrifugación antes y después del envío pueden conducir a una cuantificación excesiva de los resultados cuando se utilizan los tubos de preparación de plasma BD Vacutainer® PPTTM . En estos casos, la sobre cuantificación puede ser el resultado de una detección del ARN del VIH-1 o del ADN proviral secuestrado dentro de los glóbulos blancos y posiblemente de otros componentes celulares presumiblemente debido a una fuga celular en la barrera del gel debido a una manipulación incorrecta. Por lo tanto, el procesamiento en las muestras en los tubos son pasos importantes a tener en cuenta al evaluar y resolver discrepancias en los resultados de las pruebas de carga viral ⁽²⁵⁾.

Solo una única muestra mostro mayores valores de carga viral por bDNA en comparación a la RT-PCR, esto podría atribuirse a los polimorfismos en los lugares de unión de los cebadores o sondas, los que podrían subcuantificar la carga vírica en los individuos afectados por estos cambios. Esta sospecha teórica ha sido recientemente documentada, al detectarse que una única mutación en un cebador de Cobas® TaqMan HIV-1 de Roche reduce la cuantificación viral en $> 2 \log_{10}$, cuando se compara con otros sistemas de cuantificación ⁽²⁶⁾.

En este estudio, casi la mitad de la población evaluada presentó recuentos intermedios de linfocitos T CD4⁺ entre 200-500 cél/ mm³, sugiriendo que el grado de inmunodeficiencia no parece ser severa en estos pacientes. Al comparar la carga viral, según los niveles de ARN del VIH-1 expresado en logaritmo se demostró la existencia de una correlación inversa con significación estadística (valor de $p < 0,05$) entre carga viral y linfocitos T CD4⁺. De esta forma, una mayor carga viral se correspondió con un menor recuento de linfocitos T CD4⁺ y, por el contrario, cuanto menor fue la carga viral, mayor resultó el recuento celular. Estos resultados, coinciden con estudios previos en los cuales aunque no se haya encontrado significación estadística, por lo general aquellos casos con CD4⁺ más elevados presentaron una menor carga viral y viceversa ⁽²⁷⁻³⁰⁾. Se ha sugerido que elevados niveles de ARN del VIH-1 precede la disminución de los valores de

células CD4⁺ y constituyen el principal factor de riesgo de progresión a SIDA aún en pacientes que manejan elevados niveles de linfocitos CD4⁺ (17).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demostraron una excelente correlación al comparar los valores de carga viral obtenidos por las técnicas evaluadas. Adicionalmente se observó una correlación inversa entre los niveles de carga viral y los valores de células TCD4⁺. Por lo que se concluye que ambas técnicas de medición del número de copias de ARN del VIH-1 pueden ser usados. Se recomienda que la confirmación de los niveles plasmáticos del ARN viral se efectúe en el mismo laboratorio y con el empleo de una misma técnica para determinación de carga viral en el seguimiento de los pacientes infectados, ya que si bien los valores de carga viral se correlacionaron adecuadamente por las técnicas evaluadas en el presente trabajo, las mayores discrepancias se observaron en valores de carga viral elevada. Estas observaciones indican la necesidad de ser cautelosos en la interpretación de la significancia clínica de los resultados individuales de carga viral en el rango superior de las técnicas. Se sugiere evaluar todos los resultados obtenidos para cada caso, antes de proceder a realizar la intensificación del tratamiento o cambios en las decisiones terapéuticas, sobre todo si los datos de la carga viral longitudinal provienen de más de una técnica comercial. En consideración a los valores obtenidos por los dos ensayos evaluados, difieren entre sí en rangos de carga viral particular. Por lo tanto, puede ser confuso para los médicos si con una metodología se indica que la replicación se suprime insuficientemente, mientras el otro ensayo no detecta ARN viral, constituyendo un factor potencial de decisiones no acertadas en el tratamiento del paciente.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Roschman González por su valiosa asesoría en la realización del análisis estadístico en el presente estudio.

Al personal técnico auxiliar de la Unidad de Atención al Paciente y Toma de Muestras del INHRR, por su valiosa colaboración en la toma de las muestras según el protocolo sugerido además de la información obtenida durante las entrevistas a los pacientes.

Al personal técnico auxiliar del Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y SIDA).

A la Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del INHRR.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Majors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, *et al.* Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997; 126: 946-954.
2. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD, *et al.* Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. *Ann Intern Med.* 1997; 126: 939-945.
3. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. 2016. Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2016/gesida-guiasclinicas-2016-tar.pdf>. (Consultado 02 de febrero de 2016).
4. Murray JS, Elashoff MR, Iacono-Connors LC, Cvetkovich TA, Struble KA. The use of plasma HIV RNA as a study endpoint in efficacy trials of antiretroviral drugs. *AIDS.* 1999; 13 (7): 797-804.
5. Riddler SA, Majors JW. HIV-1 viral dynamics and viral load measurements: implications for therapy. *AIDS Clin Rev.* 1997-1998: 47-65.

6. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. 2016. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. (Consultado 02 de febrero de 2016).
7. Yan CS, Hanafi I, Kelleher AD, Carr AD, Amin J, McNally LP, *et al.* Lack of correlation between three commercial platforms for the evaluation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load at the clinically critical lower limit of quantification. *J Clin Virol.* 2010; 49: 249-253
8. Pyne MT, Konnick EQ, Phansalkar A, Hillyard DR. Evaluation of the Abbott investigational use only real time HIV-1 assay and comparison to the Roche Amplicor HIV-1 Monitor test, Version 1.5. *J Mol Diagn.* 2009; 11 (4): 347–354.
9. Salimnia H, Moore EC, Crane LR, MacArthur RD, Fairfax MR. Discordance between viral loads determined by Roche COBAS Amplicor human immunodeficiency virus type 1 Monitor (Version 1.5) standard and ultrasensitive assay caused by freezing patient plasma in centrifuged Becton-Dickinson vacutainer brand plasma tubes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (9): 4635-4639.
10. Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clin and Diagn Virol.* 1998; 10: 25-47.
11. Urdea MS. Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for the direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chem.* 1993; 39: 725-726.
12. Gutiérrez C, Pacheco M, Sánchez D, Ameli G, Moncada M, Chacón E, *et al.* Comparación de dos métodos comerciales para determinación de carga viral en plasmas provenientes de pacientes venezolanos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). *Rev Panam Infectol* 2009; 11 (2): 44-49.
13. Jeffreys AJ, Macleod A, Tamaki K, Neil DL, Moncaton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nat.* 1991; 354: 204-209.
14. Gallart, J.E. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. *JAMA.* 2000; 283: 1329-1334.

15. Pan P, Tao X, Zhang Q, Xing W, Sun X, Pei L, et al. Clinical comparison of branched DNA and reverse transcriptase-PCR and nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantitation of circulating recombinant form_BC HIV-1 RNA in plasma. *AIDS*. 2007; 21: S27–S32.
16. Katsoulidou A, Rokka C, Issaris C, Haida C, Tzannis K, Sypsa V, et al. Comparative evaluation of the performance of the Abbott RealTime HIV-1 assay for measurement of HIV-1 plasma viral load on genetically diverse samples from Greece. *Virology Journal*. 2011; 8:10.
17. Olaya P, Díaz Granados CA. Correlación y concordancia de tres técnicas de cuantificación de carga viral del VIH disponibles en Colombia. *Biomédica*. 2006; 26(2).
18. Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babiak R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol*. 2007; 38(4):304-312.
19. Henrich TJ, Wood BR, Kuritzkes DR. Increased Risk of Virologic Rebound in Patients on Antiviral Therapy with a Detectable HIV Load 48 Copies/mL. *PLoS ONE*. 2012; 7(11):e50065. doi:10.1371/journal.pone.0050065.
20. Palmer S. Advances in detection and monitoring of plasma viremia in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013; 8:000-000. doi: 10.1097/COH.0b013e32835d80af.
21. Tung YC, Ke LY, Lu PL, Lin KH, Lee SC, Lin YY, et al. Comparison of the Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HIV-1 test v1.0 with v2.0 in HIV-1 viral load quantification. *Kaohsiung J Med Scien*. 2015; 31: 188-193.
22. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno C, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TagMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: A comparative study. *J Virol Methods*. 2011; 173: 399-402.
23. Ruelle J, Jnaoui K, Lefèvre I, Lamarti N, Goubau P. Performances and comparative evaluation of the automated VERSANT HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR molecular system (kPCR) for the quantitation of HIV-1 plasma viral load. *J Clin Virol*. 2008; 44: 17-32.

24. Cobb BR, Vaks JE, Do T, Vilchez RA. Evolution in the sensitivity of quantitative HIV-1 viral load tests. *J Clin Virol.* 2011; 52: 77–82. doi:10.1016/j.jcv.2011.09.015.
25. Salimnia H, Moore EC, Crane LR, Macarthur RD, Fairfax MR. Discordance between viral loads determined by Roche COBAS AMPLICOR human immunodeficiency virus type 1 monitor (version 1.5) standard and ultrasensitive tests caused by freezing patient plasma in centrifuged Becton-Dickinson Vacutainer brand plasma preparation tubes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4635–4639.
26. Aguilera A, González J, Martínez L, Moldes M, Galán J. Evaluación crítica de los nuevos métodos comerciales para la determinación de la carga viral del VIH-1 y del VHC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28:62-67.
27. Lado FL, Prieto A, Losada E, Arias A, Cabarcos A. Correlación entre linfocitos CD4 y carga viral en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana con tuberculosis. *An Med Interna.* 2001; 18 (12): 624-628.
28. Williams PL, Currier JS, Swindells S. Joint effects of HIV-1 RNA levels and CD4 lymphocyte cells on the risk of specific opportunistic infections. *AIDS* 1999; 13 (9): 1035-1044.
29. Sufka SA, Ferrari G, Gyszowka VE, Wrin T, Fiscus SA, Tomaras GD, et al. Prolonged CD4+ cell/virus load discordance during treatment with protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy: immune response and viral control. *J Infect Dis.* 2003; 187 (7): 1027-37.
30. Foxall RB, Cortesão CS, Albuquerque AS, Soares RS, Victorino RM, Sousa AE. Gag-specific CD4+ T-cell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immuneactivation in HIV-2, but not HIV-1 infection. *J Virol.* 2008; 23.

Recibido: 03 de octubre de 2016

Aprobado: 29 de marzo de 2016