

ARTÍCULO ORIGINAL/ARTIGO ORIGINAL

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)*

Comparison of two commercial methods to determine HIV-1 plasma viral load in Venezuelan HIV-1 infected patients

Cristina Gutiérrez¹
María Eugenia Pacheco²
Doneyla Sánchez³
Gladys Ameli²
María Elena Moncada³
Elsa Patricia Chacón⁴
Dulce Morón³

¹Doctor en Microbiología, MSc en Inmunología, Caracas, Venezuela.

²Licenciada en Bioanálisis, Caracas, Venezuela.

³Licenciada en Biología, Caracas, Venezuela.

⁴Médica Microbióloga, Caracas, Venezuela.

*Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Universidad Central de Venezuela, Urbanización Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela. Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Epidemiología. Departamento de Virología, Laboratorio de Programas Especiales, Caracas, Venezuela.

Rev Panam Infectol 2009;11(2):44-49.

Conflicto de intereses: ninguno

Recibido en 11/9/2008.

Aceptado para publicación en 26/2/2009.

Resumen

Objetivos: 1) Comparar los resultados de carga viral obtenidos mediante dos técnicas de cuantificación del VIH disponibles en Venezuela. 2) Analizar la correlación entre la carga viral del VIH-1 determinada por ambas técnicas y el recuento de linfocitos CD4 en la población evaluada. **Métodos:** Se obtuvieron muestras de plasma y sangre completa provenientes de 173 pacientes infectados por VIH, referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" en Venezuela. Se evaluaron los niveles de ARN del VIH-1 en plasma mediante las técnicas VERSANT bDNA v3.0 y RT-PCR AMPLICOR MONITOR v1.5. Se cuantificó la subpoblación de linfocitos CD4+ en muestras sanguíneas mediante citometría de flujo. Se correlacionaron los resultados de carga viral obtenidos por las dos técnicas entre sí y con los recuentos de linfocitos CD4+, calculando el coeficiente de variación de Pearson y regresión lineal. **Resultados:** Se observó una correlación altamente significativa ($r_p=0,90$, $R^2=0,95$) entre los resultados de carga viral detectados por ambas técnicas en la población estudiada. La media del recuento de linfocitos CD4 fue de 414 células/mm^3 (rango: 4-1379). Se encontró una correlación inversa entre cuantificación de linfocitos CD4+ y carga viral del VIH medida por bDNA ($r_p=-0,21$, $R^2=-0,26$) y RT-PCR Amplicor ($r_p=-0,25$, $R^2=-0,29$), respectivamente. **Conclusiones:** Las dos técnicas para determinación de carga viral mostraron un alto nivel de correlación y concordancia. Aquellos casos con recuento de linfocitos T CD4+ más elevados presentaron una menor carga viral y viceversa, los que tenían linfocitos T CD4+ bajos, una mayor carga viral.

Palabras clave: Carga viral, VIH, recuento linfocitario, métodos, diagnóstico.

Abstract

Objective: 1) To compare the performance of two available

technologies for HIV quantitation in Venezuela. 2) To evaluate the relationships between CD4 lymphocytes count and both viral load techniques in blood samples from HIV-1 patients. **Methods:** Plasma and blood samples were obtained from 173 HIV patients referred to National Institute of Hygiene "Rafael Rangel" in Venezuela. HIV-1 RNA levels in plasma were evaluated using VERSANT bDNA v3.0 and RT-PCR AMPLICOR MONITOR v1.5 methods. CD4 T-lymphocytes in blood samples was quantified using flow cytometry. The relationships between viral load obtained for both techniques and viral load/CD4 count results were determined calculating Pearson correlation coefficient and linear regression. **Results:** The correlation between viral load techniques was highly significant ($r_p=0.90$, $R^2=0.95$). The mean CD4 lymphocyte count was 414 cells/mm³ (range: 4-1379). An inverse correlation was found between CD4 lymphocytes count and viral load using bDNA ($r_p=-0.21$, $R^2=-0.26$) and RT-PCR Amplicor ($r_p=-0.25$, $R^2=-0.29$), respectively. **Conclusion:** The two viral load technologies for quantitation of are adequate with high levels of correlation and concordance. A significant inverse correlation between CD4 lymphocyte count and HIV-1 viral load was observed: a high CD4 lymphocyte count was associated to a low viral load and inversely a low CD4 lymphocyte count was found with a high viral load using both techniques.

Key words: Viral load, HIV, technologies, CD4 count, diagnostic.

Introducción

Se ha demostrado que el uso de fármacos antiretrovirales altamente efectivos en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) resulta en una reducción de la carga viral plasmática y en un incremento en el número de linfocitos T CD4+.⁽¹⁾ La evaluación de los niveles de ARN genómico viral constituye un buen marcador en el monitoreo de la eficacia del tratamiento antiretroviral ya que la cantidad de virus medida en plasma es una indicación directa de la producción del virus y de la velocidad de destrucción de los linfocitos T CD4+.⁽²⁾

En los últimos años se han desarrollado diversas tecnologías de cuantificación viral, las cuales pueden dividirse en 2 categorías: 1) donde la carga viral es detectada mediante amplificación de una señal proporcional a los niveles de ARN viral en lugar de la amplificación de una secuencia específica, por ejemplo, el ensayo ADN ramificado (bDNA, "branched DNA" en inglés) de Bayer;⁽³⁾ 2) donde el ADN molde es amplificado luego de una reacción de transcripción reversa y la medida de carga viral se realiza en base al uso de un estándar de cuantificación interno. Tal es el caso del ensayo RT-PCR Amplicor Monitor (RT-PCR Monitor)

desarrollado por Roche.⁽⁴⁾ A pesar que las técnicas de cuantificación del ARN no guardan una relación lineal entre sí, las mismas proporcionan una información valiosa y confiable. Sin embargo, numerosos estudios han comparado los resultados obtenidos por distintos ensayos de cuantificación del ARN viral con hallazgos variables.⁽⁵⁻⁸⁾

El presente estudio tiene como propósito comparar los resultados de carga viral obtenidos por dos técnicas comercialmente disponibles en plasmas de pacientes infectados por VIH a fin de evaluar si estos ensayos pueden ser utilizados indistintamente en el monitoreo de un grupo de pacientes en Venezuela o bien, si el cambio de un método a otro para la evaluación de una misma población podría afectar la interpretación de los resultados obtenidos de carga viral en el supuesto caso en que ambos ensayos mostraran una baja correlación. Se pretendió además correlacionar los niveles de carga viral obtenidos por cada uno de los ensayos evaluados y los valores absolutos de linfocitos T CD4+ determinados en la población evaluada. Se trata del primer reporte sobre correlación de métodos de carga viral a partir de plasmas de pacientes infectados por VIH-1 en Venezuela.

Materiales e métodos

Población evaluada. Se seleccionaron y evaluaron un total de 173 muestras sanguíneas provenientes de pacientes infectados por VIH-1, en edades comprendidas entre 3 y 65 años, quienes asistieron al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) durante el período: mayo-agosto 2006 para determinación rutinaria de carga viral y recuento de linfocitos T CD4+. Los pacientes evaluados presentaban diagnóstico confirmado de VIH por pruebas de ELISA y análisis de Western Blot, realizados anteriormente. En adición, se analizaron 50 plasmas provenientes de individuos negativos para la presencia del VIH-1, según evaluación serológica previa, las cuales fueron utilizadas como controles negativos.

Recolección y procesamiento de las muestras para determinación de la carga viral del VIH-1. Se seleccionaron 173 plasmas con solicitud de análisis de carga viral del VIH-1. A estas muestras se les cuantificó el ARN del VIH por dos métodos: Versant bDNA 3.0® (Bayer) y RT-PCR Amplicor Monitor HIV v1.5® (Roche).

Para la toma de las muestras sanguíneas, se emplearon 2 tubos con EDTA al 10% por cada paciente, una de las cuales se sometió a centrifugación (14.000 rpm) por 10 minutos dentro de las 2 horas de recolección y las muestras de plasmas obtenidas fueron inmediatamente almacenadas a -70°C. La otra muestra de sangre completa obtenida de cada paciente fue destinada al recuento de linfocitos T CD4+. Todas las

muestras se recolectaron y analizaron en el Laboratorio de Programas Especiales del INHRR.

(i) bDNA v3. La muestra de plasma obtenida por paciente fue evaluada por el ensayo VERSANT HIV-1 branched DNA version 3.0 (Bayer, Alemania), de acuerdo a las especificaciones de la técnica. El rango de cuantificación para el ensayo bDNA versión 3.0 es de 50 a 500000 copias de ARN/ml y emplea 1 ml de plasma. Brevemente, se basa en la amplificación de una señal en vez de una secuencia específica.⁽³⁾ 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 (pre-amplificadora y amplificadora) a su vez permiten la unión del ARN viral a moléculas de ADN ramificadas con múltiples copias de fosfatasa alcalina. Posteriormente, se incubó el complejo con un sustrato quimioluminiscente (dioxetano) 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.

(ii) RT-PCR Monitor. Otra alícuota de la muestra de plasma obtenido por cada paciente fue analizada a través del método estándar del ensayo RT-PCR COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, versión 1.5, el cual presenta un rango de detección de carga viral entre 400 a 750000 copias de ARN/ml y utiliza 200 μ l de muestra. 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 en una placa de micro-titulación.⁽⁹⁾ La técnica utiliza un volumen de plasma de 0,2 ml para la extracción del ARN viral, según especificaciones del producto. La transcripción reversa, amplificación y detección de los niveles de ARN viral fueron realizadas en un analizador COBAS AMPLICOR automatizado. Se procesaron 2 controles positivos y uno negativo por cada 24 muestras evaluadas.

Cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias CD4/CD8. Se analizaron 173 muestras de sangre completa provenientes de la población evaluada para la cuantificación de la subpoblación linfocitaria CD4+ (expresados en valores absolutos de células/mm³) mediante Citometría de Flujo por el Sistema FACS Count, Becton Dickinson.

Análisis 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 cuantita-

tivas se expusieron en medias y fueron analizadas a través de los estadígrafos: media aritmética y la prueba de Wilcoxon (no paramétrico). Adicionalmente, se determinó la concordancia entre técnicas, categorizando el número de copias según dos puntos de cortes críticos para la toma de decisiones clínicas (menor de 400 copias, entre 400 y 100000 copias y mayor a 100000 copias)⁽¹⁰⁻¹²⁾ y se calculó el nivel kappa no ponderado para cada comparación.

La correlación entre los resultados de carga viral medida por ambos métodos se evaluó mediante coeficiente de correlación de Pearson (r_p), regresión lineal y el valor de p. Para el estudio de la analogía entre las variables, niveles de ARN del VIH-1 obtenidos por cada método y recuento de linfocitos T CD4+ se utilizó como estadígrafo el cálculo de r_p . El análisis estadístico fue realizado, utilizando el programa computarizado "Simcalc Probability Calculator".

El presente estudio fue aprobado para su ejecución por las Comisiones Científica y Ética del INHRR, no existiendo conflicto de intereses.

Resultados

Cada muestra de la población estudiada fue analizada una vez en dos corridas diferentes por los métodos de carga viral evaluados. Se encontraron niveles detectables de ARN del VIH-1 en los 173 pacientes evaluados y valores de carga viral indetectables en las 50 muestras utilizadas como controles negativos por ambos métodos. La media de la carga viral fue de 3,3 \log_{10} y 3,8 \log_{10} en la población estudiada mediante los ensayos bDNA y RT-PCR Amplicor, respectivamente, observándose que los valores de carga viral obtenidos por RT-PCR Amplicor eran más elevados en comparación con bDNA. La frecuencia con que la diferencia de carga viral superó los 0,5 logaritmos entre ambas técnicas fue de 37,6% (65/173 muestras). Al estratificar la carga viral como parámetro en cuatro niveles: 400-< 30000 copias/ml (2,6-< 4,5 \log_{10}), 30000-100000 copias/ml (4,5-5 \log_{10}), > 100000-400000 copias/ml (>5-5,6 \log_{10}) y > 400000 copias/ml (> 5,6 \log_{10}), la distribución fue la siguiente: 106 (61%), 36 (21%), 23 (13%) y 8 muestras (5%), respectivamente.

La correlación de los métodos fue altamente significativa ($r_p=0,90$, $R^2=0,95$, figura 1). La tabla 1 muestra el número de casos concordantes y discordantes para cada categoría de carga viral entre RT-PCR Amplicor Monitor HIV y bDNA. La concordancia entre las pruebas fue buena (kappa=0,80, valor de $p<0,001$). La frecuencia con que la diferencia de cargas virales entre ambos métodos superó los 0,5 \log_{10} fue de 11,6% (20/173 muestras).

La media del recuento de linfocitos CD4 fue de 414 células/mm³ (rango: 4-1379). Al estratificar dicho

**Tabla 1. Concordancia y discordancia de RT-PCR Ampli-
cor Monitor y bDNA para dos categorías de importancia
clínica. Los contenidos de cada casilla se expresan en
valores absolutos (número total de observaciones con
cada técnica = 173).**

		Amplificador Monitor	
		400-100000	>100000
BDNA	400-100000	145	11
	>100000	1	16

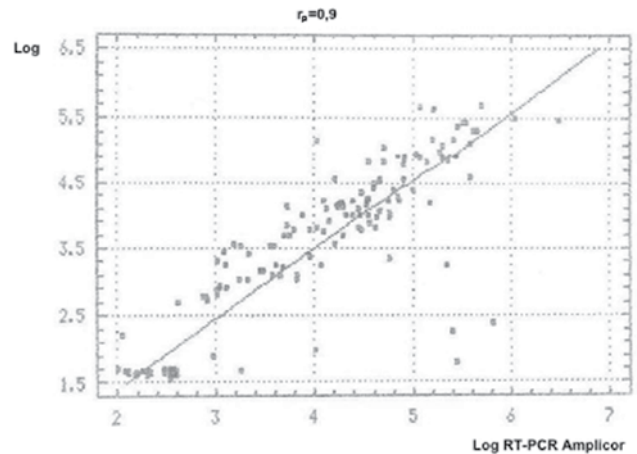
parámetro en tres niveles: < 200 cél/mm³, 200-500 cél/mm³ y > 500 cel/ mm³, la distribución fue la siguiente: 51 (29,5%), 84 (48,5%) y 38 muestras (22%), respectivamente.

Se encontró una correlación inversa entre cuantificación de linfocitos CD4+ y carga viral del VIH determinada mediante bDNA ($r_p = -0,21$, $R^2 = -0,26$, valor de $p < 0,05$) y RT-PCR Ampli-
cor ($r_p = -0,25$, $R^2 = -0,29$, valor de $p < 0,05$), respectivamente. Por lo general, se demostró una mayor carga viral en aquellos casos que presentaban recuentos bajos de linfocitos CD4+ y una menor carga viral en aquellos con recuentos de CD4 más elevados (figuras 2 y 3).

Discusión

La carga viral expresa el número de partículas virales circulantes a nivel sanguíneo, permitiendo una mayor comprensión sobre la dinámica del virus en el organismo en cuanto al estado de la infección, riesgo de progresión y efectividad del tratamiento. Se ha sugerido que la disminución de los niveles de ARN del VIH-1 en plasma a valores indetectables se asocia a una supresión viral más completa, lo cual es importante en la prevención de una posible resistencia frente al tratamiento antiretroviral.⁽¹³⁾

En el presente trabajo, todas las muestras presentaron niveles de ARN del VIH-1 detectables por ambas técnicas, observándose que más de la mitad (61%) de la población evaluada presentó bajos niveles de carga viral. Estos plasmas fueron escogidos al azar y de manera consecutiva a partir del lote de muestras de pacientes referidos al INHRR para determinación de la carga viral del VIH. En general, se correlaciona lo que cada una de las técnicas de cuantificación viral mide u “observa” independientemente de lo que esté sucediendo con el paciente. Así, se determinó la concordancia y discordancia entre las técnicas bDNA y Ampli-
cor Monitor con dos de las tres categorías de



**Figura 1. Correlación entre logaritmos de carga viral (log₁₀ copias/ml) con técnicas Versant DNAb y RT-PCR Ampli-
cor HIV v1.5.**

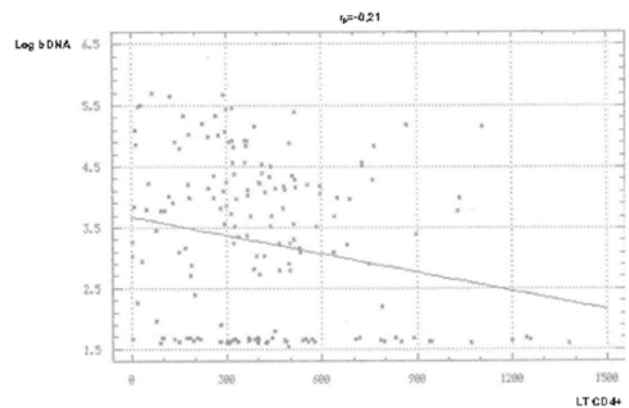
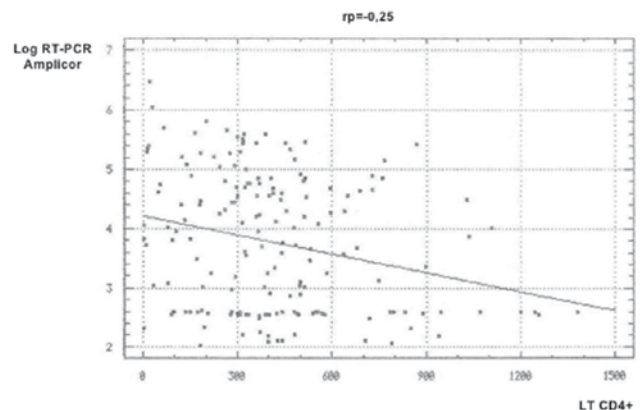


Figura 2. Correlación entre recuento de linfocitos T CD4+ (cél/mm³) y logaritmos de carga viral (log₁₀ copias/ml) con la técnica Versant DNAb.



**Figura 3. Correlación entre recuento de linfocitos T CD4+ (cél/mm³) y logaritmos de carga viral (log₁₀ copias/ml) con la técnica RT-PCR Ampli-
cor Monitor v1,5.**

importancia clínica descritas⁽¹⁴⁾ debido a la ausencia de muestras con niveles de carga viral indetectables. Sería de particular interés evaluar pacientes para quienes el rango de carga viral incluya niveles de ARN del VIH-1 indetectables, bajos, intermedios y altos en diferentes fases de la infección.

En este estudio se obtuvo un excelente nivel de correlación entre técnicas con un coeficiente de correlación de 0,90 (figura 1), evidenciando que la variabilidad de una técnica se puede explicar casi en su totalidad por la variabilidad de la otra. Las pruebas mostraron también excelente concordancia (ver tabla 1), con un kappa no ponderado de 0,80. Diversos estudios han comparado diferentes métodos de carga viral con hallazgos variables. En alguna de estas investigaciones se ha encontrado una baja correlación ($r=0,50$) entre los resultados de carga viral del VIH-1 obtenidos por los ensayos bDNA v3 y RT-PCR Amplicor Monitor 1.5.⁽⁵⁾ Sin embargo, otros autores han reportado una elevada correlación (desde $r=0,89$ hasta $r=0,97$) y concordancia entre ambas técnicas^(6,7,14-16) coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Estos hallazgos sugieren que estas dos técnicas de cuantificación pueden ser usadas en la medición del número de copias de ARN del VIH-1, para representar el "estatus" de la viremia en el paciente infectado. La correlación fue adecuada con los niveles bajos de los rangos dinámicos de las dos pruebas usadas, sugiriendo una sensibilidad similar entre las dos técnicas.

Al comparar las medias de las cargas virales obtenidas por las técnicas evaluadas se observó que las lecturas obtenidas mediante bDNA fueron inferiores a RT-PCR Amplicor, lo cual concuerda con lo descrito en reportes previos.⁽¹⁶⁾ En adición, la diferencia del logaritmo de la carga viral de una técnica a otra fue superior a 0,5 logaritmos en un número importante de casos 37,6% (65/173 muestras). El conocimiento de los niveles plasmáticos de ARN del VIH junto al recuento de linfocitos T CD4+ permite monitorear la evolución de la infección viral. De allí que los hallazgos anteriores permiten sugerir que aunque ambas técnicas tengan excelente correlación, las decisiones clínicas pueden verse afectadas con frecuencia si las técnicas se intercambian de manera indistinta.

En este trabajo casi la mitad de la población evaluada presentó recuentos intermedios de linfocitos T CD4+ entre 200-500 células/mm³, sugiriendo que el grado de inmunodeficiencia no parece ser severa en estos pacientes. Sin embargo, una limitación del presente estudio fue no tener acceso a la historia clínica de manera que los pocos datos epidemiológicos de los pacientes se obtuvieron a través de la entrevista realizada a cada individuo al momento de la toma de la muestra. Sería interesante poder evaluar pacientes con

acceso a su historia clínica a fin de corroborar el estatus inmunológico en relación a signos, síntomas y toma o no de tratamiento antirretroviral de los pacientes.

Al estratificar la carga viral, según los niveles de ARN del VIH-1 expresado en logaritmos 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 hallazgos se obtuvieron utilizando ambas técnicas de carga viral (ver figuras 2 y 3). Nuestros 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.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ 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+.⁽²¹⁾

En conclusión, los resultados del presente estudio demostraron una excelente correlación al comparar los valores de carga viral obtenidos por las técnicas evaluadas. En adición, se observó una correlación inversa entre los niveles de carga viral y los valores de células CD4+. Se sugiere además que los dos ensayos de cuantificación estudiados pueden ser usados en la medición del número de copias de ARN del VIH-1, lo cual representa el "estatus" de la viremia. Se recomienda que la confirmación de los niveles plasmáticos de ARN del VIH-1 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.

Agradecimientos

A la Lic. Isaura Albornoz por su colaboración en la determinación de carga viral del VIH-1 por RT-PCR Amplicor Monitor en alguna de las muestras pertenecientes a la población evaluada y al Profesor Leovigildo García por su valiosa asesoría en la realización del análisis estadístico en el presente estudio.

Al personal técnico auxiliar del Departamento de Atención al Paciente 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.

Referencias

1. Li TS, Tubiana R, Katlama V, Calvez H, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4-T cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998;351:1682-1686.

2. Katzenstein TL. Molecular biological assessment methods and understanding the course of the HIV infection. *APMIS Suppl.* 2003;114:1-37.
3. Urdea MS. Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for the direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chem* 1993;39:725-6.
4. Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clinical and Diagnostic Virology* 1998;10:25-47.
5. Holguín A, Mendoza C, Soriano V. Comparison of three different commercial methods for measuring plasma viraemia in patients infected with non-B HIV-1 subtypes. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis* 1999;18:256-259.
6. Highbarger HC, Alvord G, Jiang MK, Shah AS, Metcalf JA, Lane H et al. Comparison of the Quantiplex version 3.0 assay and a sensitized Amplicor Monitor Assay for measurement of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma samples. *J of Clin Microbiol.* 1999;Nov.:3612-3614.
7. Murphy DG, Coté L, Fauvel M, René P, Vincelette J. Multicenter comparison of Roche Cobas Amplicor Monitor version 1.5, Organon Tecknika Nuclisens QT with extractor, and Bayer Quantiplex version 3.0 for quantification of human immunodeficiency virus type-1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 2000;Nov.;4034-4041.
8. Grimes RM, Lewis ST, Visnegarwala F, Goodly J, Sutton R, Rodríguez-Barradas M. Use of bDNA testing in the immunologically nonresponding patient who has a low or undetectable viral load by RT-PCR testing. *HIV Clin Trials* 2003;Mar-Apr;4(2):92-8.
9. Jeffreys AJ, Macleod A, Tamaki K, Neil DL, Moncanton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*1991;354:204-209.
10. Phillips A. Short-term risk of AIDS according to current CD4 cell count and viral load in antiretroviral drug-naïve individuals and those treated in the monotherapy era. *AIDS* 2004;18:51-8.
11. DeJesus E, McCarty D, Farthing CF, Shortino DD, Grinsztejn B, Thomas BA, et al. Once-daily versus twice-daily lamivudine, in combination with zidovudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naïve adults with HIV Infection: a randomized equivalence trial. *Clin Infect Dis* 2004;39:411-8.
12. Saag MS, Cahn P, Raffi F, Wolff M, Pearce D, Molina JM, et al. Efficacy and safety of emtricitabine vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a randomized trial. *JAMA* 2004;292:180-9.
13. Gallart, J.E. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. *JAMA* 2000;283:1329-1334.
14. Swanson P, Soriano V, Devare SG, Hackett J Jr. Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0. *J Clin Microbiol* 2001;39:862-70.
15. Zanchetta N, Nardi G, Tocalli L, Drago L, Bossi C, Pulvirenti FR. Evaluation of the Abbott LCx HIV- 1 RNA quantitative, a new assay for quantitative determination of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 2000;38:3882-6.
16. Olaya P, Díaz Granados CA. Correlación y concordancia de tres técnicas de cuantificación de carga viral del VIH disponibles en Colombia. *Biomédica* 2006;jun:26(2).
17. 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.
18. 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.
19. 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 Apr 1;187(7):1027-37.
20. 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 immune-activation in HIV-2, but not HIV-1 infection. *J Virol* 2008 Jul;23. En prensa.
21. Hennessey KA, Giorgi JV, Kaplan AH, Visscher BR, Gange S, Margolick JB, et al. AIDS onset at high CD4+ cell levels is associated with high HIV load. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2000;16(2):103-107.

Correspondencia:

Dra. Cristina Gutiérrez García

Ciudad Universitaria de Caracas, Detrás del Hospital Clínico Universitario, Edificio Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"; Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y Sida), Departamento de Virología, Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Epidemiología. 60412. Los Chaguaramos, Caracas - Venezuela 60412. e-mail: cristicharo@yahoo.com