

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Quantificação da carga viral do HIV-1 no líquor: comparação entre os
ensaios Abbott m2000rt e COBAS TaqMan v2.0**

Ana Júlia Bretanha Luz

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Quantificação da carga viral do HIV-1 no líquido: comparação entre os
ensaios Abbott m2000rt e COBAS TaqMan v2.0**

Ana Júlia Bretanha Luz

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Sprinz.

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Bretanha Luz, Ana Júlia

Quantificação da carga viral do HIV-1 no líquor:
comparação entre os ensaios Abbott m2000rt e COBAS
TaqMan v2.0 / Ana Júlia Bretanha Luz. -- 2017.
52 f.

Orientador: Eduardo Sprinz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Quantificação da carga viral do HIV-1 no líquor.
2. Comparação entre os ensaios Abbott m2000rt e COBAS
TaqMan v2.0. I. Sprinz, Eduardo, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Diego Falci

Dr. Marino Bianchin

Dra. Fernanda de Paris

Dra. Nêmora Tregnano Barcellos

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à Deus por colocar as melhores pessoas no meu caminho, por me manter firme nos momentos difíceis e a quem devo todas as minhas conquistas.

À minha família pelo carinho e apoio dado nos momentos difíceis, em especial mãe e pai, que sempre estão presentes, mesmo de longe. Pai, pelo apoio e estímulo, e por ter me ensinado a ir em busca dos meus objetivos e a valorizar a formação profissional. Mãe, que me dá forças, me ouve e me conforta sempre e que sofre em paralelo nos momentos difíceis. Pelas orações incansáveis que me destinaram, em especial, mãe e vó Zita. Pelo carinho e cuidado da Vó Sirley durante todos esses anos.

À Carine Kolling e ao Rodrigo Paiva, os quais serei eternamente grata pela imensa boa vontade, carisma e por toda assistência prestada! Vocês são os melhores!

Ao Prof. Dr. Eduardo Sprinz, por todos esses anos de convivência e aprendizado, pelo acolhimento, competência e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Às minhas amigas que se dispuseram a me ajudar de alguma forma, especialmente a Carla, minha amiga mais prestativa que não mediu esforços para me auxiliar. Ao meu amigo Lucas que, como sempre, se dispõe a me ajudar e que também não mede esforços.

A todos que compreenderam minha ausência em momentos importantes de suas vidas.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular do HCPA, pela gentileza e apoio que me foi destinado.

À Abbott, por ter colaborado com a realização desse trabalho a partir da disponibilização de um kit para as análises.

E, finalmente, à equipe do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de crescimento, aprendizado e realização profissional e principalmente pelo acolhimento e apoio durante todo o processo de formação.

**Va a comenzar la única justa de las batallas
No duele el golpe, no existe el miedo
Quítate el polvo, ponte de pie y vuelves al ruedo”
“Llegó el momento, caen las murallas**

Shakira

RESUMO

Introdução

A preocupação crescente com as possíveis consequências da replicação viral no sistema nervoso central mostra a necessidade da detecção do HIV no compartimento cerebral. O teste de PCR em tempo real desenvolvido pela Abbott, o Abbott m2000 RealTime HIV-1 (m2000rt), quantifica a carga viral do HIV em amostras de sangue com um procedimento efetivo e de baixo custo no nosso país, por isso é adotado como método padrão pelo Ministério da Saúde, mas não é utilizado em amostras de líquido. O ensaio produzido pela Roche, o COBAS TaqMan HIV-1, version 2 (COBAS v2.0), é o método de PCR em tempo real que tem sido amplamente utilizado para detectar a carga viral do HIV no compartimento cerebral. No entanto, esse método ainda não foi validado para esse propósito e seu custo pode ser uma limitação em diversas regiões com baixos recursos.

Objetivos

Considerando que não há uma metodologia padronizada para essa situação específica (detecção do HIV no líquido), nós conduzimos esse estudo a fim comparar os desempenhos dos testes m2000rt e COBAS v2.0, na tentativa de propor um método alternativo e com baixos custos ao mais utilizado nesse contexto (COBAS v2.0).

Métodos

O estudo foi realizado no período de maio de 2015 a julho de 2016. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em dados de um estudo piloto que revelaram ser necessário um número mínimo de 37 amostras, para detectar uma diferença de 0,20 \log_{10} na carga viral, com um coeficiente de correlação de 0,979 e um poder de 90%. Essa equação permitiria uma perda de 10%.

As amostras de líquido foram coletadas consecutivamente a partir de 37 pacientes HIV positivos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. Os métodos foram processados de acordo com o proposto pelo fabricante para utilização com amostras de plasma. Pequenas modificações foram necessárias no teste em estudo (m2000rt) para neutralizar qualquer diferença metodológica e evitar vieses de mensuração: o congelamento das amostras foi realizado a -20°C até o momento da análise.

O ensaio COBAS v2.0 foi utilizado como referência, uma vez que é o método mais utilizado. Foram realizadas análises quantitativas com resultados que estavam dentro da faixa

linear em ambos os métodos (n = 18). Para tornar os métodos comparáveis, adotou-se o limite de detecção do ensaio m2000rt para ambos (40 cp/mL ou 1,60 log₁₀ cp/mL). Os resultados abaixo do limite de detecção foram apresentados como uma variável categórica, uma vez que não são quantificáveis. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para comparar os métodos. A normalidade das variáveis foi então resumida calculando o viés estimado pela diferença média "d" e o desvio padrão das diferenças realizadas pelo teste t para amostras pareadas. Com base na falta de normalidade dos métodos, o grau de concordância dos resultados das cargas virais de HIV foi analisado pelo índice Kappa.

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS)/ Brasil, registrado na Plataforma Brasil como sendo CAAE: 35072214.7.0000.532.

Conclusão

Em conclusão, o teste m2000rt que foi modificado para este ensaio mostrou boa concordância e correlação com o teste mais utilizado nesse contexto e pode ser considerado um método alternativo com resultados semelhantes ao COBAS v2.0 e baixos custos na quantificação da carga viral do HIV no líquido. Sugerimos, principalmente em locais onde este método está prontamente disponível com uma relação custo-benefício aceitável, que o exame m2000rt deva ser realizado.

Palavras chave: Abbott m2000rt HIV-1; COBAS TaqMan HIV-1, version 2; m2000rt; COBAS v2.0; HIV; líquido; sistema nervoso central; carga viral.

ABSTRACT

Introduction

Growing concern about possible consequences of viral replication in the central nervous system shows the need for HIV detection in the cerebral compartment. The real time PCR test developed by Abbott, Abbott *RealTime* m2000 HIV-1 (m2000rt) quantifies HIV viral load in blood samples effectively and with low costs Brazil. It is the standard method by the Brazilian Ministry of Health, but it has never been utilized to measure HIV in cerebrospinal fluid samples. The assay produced by Roche, COBAS TaqMan HIV-1, version 2 (COBAS v2.0) is the real-time PCR method that has been widely used to detect HIV viral load in cerebral compartment. However, this method has not yet been validated for this purpose and its cost may be a limitation in several regions in the world with low resources.

Objective

Taking under consideration that there was no standard methodology for this specific situation (detecting HIV in cerebrospinal fluid), we conducted this study to compare the performances of the m2000rt and COBAS v2.0 assays, to propose an alternative and low-cost method to more used in this context (COBAS v2.0).

Methods

The study was conducted from May 2015 to July 2016.

The sample size calculation was based on data from a pilot trial that revealed that a minimum of 37 samples would be needed to detect a difference of 0.20 \log_{10} in viral load, with a correlation coefficient of 0.979 and a 90% power. This equation would allow a 10% lost.

CSF samples were collected consecutively from 37 HIV-positive patients seen at Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS. Methods were processed according to proposed by the manufacturer for utilization with plasma samples. Small modifications were necessary in the study test (m2000rt) to neutralize any methodological differences, thus avoiding measurement bias: the freezing of samples was carried out at -20°C until the moment of the analysis. The COBAS v2.0 test was used as a reference since it is the most commonly used method. Quantitative analyzes were performed with results that were within the linear range in both methods ($n=18$). To make the methods comparable, the detection limit of the m2000rt assay for both (40 cp/mL or 1.60 \log_{10} cp/mL) was adopted. The results below the limit of detection

were presented as a categorical variable, since they are not quantifiable. The Pearson correlation coefficient was used to compare methods. The normality of the variables was then summarized calculating the estimated bias by the mean difference "d̄" and standard deviation of the differences performed by t test for paired samples. Based on the lack of normality of the methods, the degree of agreement of the HIV viral load results was analyzed by the Kappa index. This study was approved by the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (southern Brazil) Ethics Review Board, registered in the Brazil Platform as CAAE: 35072214.7.0000.532.

Conclusion

In conclusion, the m2000rt test that was modified for this trial showed good agreement and correlation with the most used test in this context and can be considered an alternative method with similar results to COBAS v2.0 and low costs in the HIV viral load quantification in cerebrospinal fluid. We suggest, especially in places where this method is readily available with an acceptable cost-benefit ratio, that the m2000rt exam should be performed.

Keywords: Abbott m2000rt HIV-1; COBAS TaqMan HIV-1, version 2; m2000rt; COBAS v2.0; HIV; cerebrospinal fluid; central nervous systems; viral load.

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Table 1: HIV viral load results by Abbott m2000 RealTime and COBAS TaqMan v2.0 (\log_{10} cp/mL)

Table 2: Distribution of HIV viral load to detectable and undetectable (below limit of detection) results by Abbott m2000 RealTime and COBAS TaqMan v2.0

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Figure 1: Correlation between Abbott m2000 RealTime and COBAS TaqMan v2.0 methods on HIV viral load quantification in cerebrospinal fluid.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANI	Asymptomatic Neurocognitive Impairment; Deficiência Neurocognitiva Assintomática
------------	---

ARV	Antirretroviral
------------	-----------------

COBAS v2.0	COBAS TaqMan HIV-1, version 2 COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® 48 HIV-1, version 2; Roche Diagnostic Systems
-------------------	---

HAD	HIV- Associated Dementia; Demência Associada ao HIV
------------	---

HAND	HIV- Associated Neurocognitive Disorders; Transtornos Neurocognitivos Associados ao HIV
-------------	---

LCR	Líquor
------------	--------

MND	Mild Neurocognitive Disorders; Desordem Neurocognitiva Leve/Moderada
------------	--

MS	Ministério da Saúde
-----------	---------------------

m2000rt	Abbott RealTime m2000 HIV-1
----------------	-----------------------------

PQ	Produto de Quantificação
-----------	--------------------------

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
---------------	--

SNC	Sistema Nervoso Central
------------	-------------------------

TARV	Terapia Antirretroviral
-------------	-------------------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	INFEÇÃO PELO HIV-1 NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	14
2.2	DISTÚRBIOS NEUROCOGNITIVOS ASSOCIADOS AO HIV	15
2.3	ANTIRRETROVIRAIS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	17
2.4	ESCORE DE EFETIVIDADE DE PENETRAÇÃO NO SNC	18
2.5	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HIV	20
2.6	ESCOLHA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE(86)	21
2.7	ENSAIO ABBOTT M2000 REALTIME HIV-1 (20).....	22
2.8	ENSAIO COBAS® AMPLIPREP/ COBAS® TAQMAN® 48 HIV-1, VERSION 2 (18)	23
2.9	COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS ABBOTT REALTIME M2000 HIV-1 E COBAS® AMPLIPREP/ COBAS® TAQMAN® 48 HIV-1, VERSION 2; ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEMS.....	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	27
4	JUSTIFICATIVA	28
5	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A introdução da terapia antirretroviral (TARV) diminuiu a incidência da maioria das doenças oportunistas em pacientes infectados pelo HIV-1, incluindo as que comprometem o sistema nervoso central (SNC). Entretanto, as alterações neurocognitivas associadas ao HIV (HAND, HIV-associated neurocognitive disorders) continuam comuns. (1) Várias explicações para estes resultados são possíveis. Uma delas é que a lesão cerebral que ocorre antes da supressão virológica sustentada pode ser apenas parcialmente revertida com a TARV.(2) Outra explicação é que o SNC pode ser um potencial santuário orgânico que alberga o HIV-1 de forma saliente e que a terapia nem sempre consegue atingir. Isso permite que a replicação viral possa permanecer ativa, embora atenuada, mesmo com viremia plasmática abaixo do limite de detecção. (3–7) A preocupação crescente com as possíveis consequências dessa replicação, como as complicações neurológicas, além da indução de mutações de resistência aos fármacos no líquido (LCR) mostra a necessidade da detecção do HIV no compartimento cerebral. (8–13)

O método COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® 48 HIV-1, version 2; Roche Diagnostic Systems (referido como COBAS v2.0) foi introduzido em 2008 para substituir o ensaio anterior na quantificação da carga viral do HIV em plasma humano.(14–16) Esse ensaio tem sido utilizado mundialmente para detectar a carga viral do HIV no SNC, no entanto, este ensaio ainda não foi validado e seus custos podem ser limitados em várias regiões do planeta. (17–19) Por outro lado, em muitas partes do mundo, o Abbott m2000 RealTime HIV-1 (m2000rt) é o mais utilizado. O teste m2000rt quantifica a carga viral do HIV em amostras de sangue com um procedimento efetivo e de baixo custo. Por isso, desde abril de 2013, é adotado como método padrão pelo Ministério da Saúde (MS) visando uma aplicação racional dos recursos. (20)

Ambos os ensaios destinam-se à regiões altamente conservadas do genoma do HIV-1. A região que codifica a integrase é localizada no gene pol no ensaio m2000rt e no gene gag no ensaio COBAS v2.0. Esses dois testes utilizam uma tecnologia de quantificação molecular de ponta (PCR em tempo real), mas diferem em todos os outros aspectos: no sistema de extração, no alvo dos iniciadores, no projeto da sonda e no método de quantificação. (19)

O objetivo deste estudo foi comparar os desempenhos dos testes m2000rt e COBAS v2.0 ao considerar a detecção da carga viral no LCR, embora nenhum deles tenha sido validado, no intuito de propor um método alternativo ao mais utilizado nesse contexto (COBAS v2.0) e com baixos custos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a revisão da literatura foram consultadas as bases de dados LILACS, Scielo e Pubmed, utilizando as palavras chaves “Abbott m2000rt HIV-1”, “COBAS TaqMan HIV-1, version 2”, “m2000rt”, “COBAS v2.0”, “HIV”, “cerebrospinal fluid”, “reservoir”, “central nervous system”, “viral load” e suas combinações, onde 110 artigos foram selecionados para sustentar a questão de pesquisa.

2.1 INFECÇÃO PELO HIV-1 NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O HIV pode ser tão precoce, quanto infiltrar-se no SNC oito dias após a transmissão.(21) A infecção no cérebro é estabelecida durante a viremia primária, momento em que ocorre a ativação imunológica e que o HIV já pode ser detectado no LCR e no tecido cerebral.(21–27) No SNC, a viremia mostrou-se 2,42 vezes menor que no plasma. (21)

O papel central da neuropatogênese do HIV é desempenhado pelos monócitos/macrófagos.(21–25) Macrófagos ativados e células dendríticas liberam, via receptores sensíveis ao patógeno, citocinas e quimiocinas que direcionam o processo de migração de células circulantes infectadas.(28,29) Dentre as citocinas pró-inflamatórias estão incluídas TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e INF α , e nas quimiocinas, CCL2 e CCL5.(30,31)

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular que envolve basicamente a microcirculação: ocorre vasodilatação local mediada pelas citocinas e os monócitos infectados ligam-se, então, às moléculas de adesão do endotélio vascular, sendo guiados por quimiocinas.(28,29,32) O HIV-1 aproveita-se da presença destes mediadores acoplados ao monócito infectado para, mais facilmente, atravessar o endotélio. Além disso, também utiliza as vias paracelulares, o que intensifica a entrada de mais monócitos carreadores de HIV-1 para o SNC.(33) Após atravessarem a barreira hematoencefálica, os monócitos infectados migram para o tecido inflamado, são diferenciados em macrófagos e serão responsáveis pela disseminação do vírus aos macrófagos fixos residentes no local.(34–36)

Uma vez que o SNC pode ser um compartimento isolado, a infecção local pelo HIV pode ter comportamento distinto. Pode ocorrer a persistência viral e a seleção de mutações do HIV que podem conferir resistência aos antirretrovirais (ARVs). (37–39) No caso da

persistência e/ou desequilíbrio da resposta à infecção, um estado de inflamação crônica é estabelecido.(40,41)

Existe provavelmente uma associação bidirecional complexa entre a inflamação e a replicação residual do HIV-1. A inflamação residual pode contribuir para a persistência do HIV-1 por indução da reinfecção em células TCD4+ ativadas, regulando positivamente a expressão de bloqueadores do controle imunitário e das respostas imunitárias específicas ao HIV-1.(42) A replicação persistente do HIV-1 pode, por sua vez, contribuir para um ambiente inflamatório.(43,44) Como consequência, as proteínas do HIV produzidas nas células infectadas induzem toxicidade neuronal, e a morte neuronal pode ocorrer, por necrose ou apoptose, via processamento e apresentação de antígenos virais às células TCD8+, podem ser responsáveis pelo comprometimento das funções cognitivas e executivas dos indivíduos infectados. (33,45–49)

2.2 DISTÚRBIOS NEUROCOGNITIVOS ASSOCIADOS AO HIV

As complicações neurológicas mais comuns do HIV incluem: distúrbios neurocognitivos associados ao HIV (HAND), doença cerebrovascular e neuropatia periférica.(50,51)

A HAND é descrita, clinicamente, como uma série de distúrbios que compreendem deficiência neurocognitiva assintomática (ANI), desordem neurocognitiva leve/moderada (MND) ou a forma mais grave, demência associada ao HIV (HAD).(53) A classificação dos distúrbios neurocognitivos depende basicamente de duas variáveis: avaliação neuropsicológica e avaliação do impacto da doença nas atividades da vida diária (Tabela 1).(54)

Tabela 1: Distúrbios Neurocognitivos Associados ao HIV	
<i>Alteração neurocognitiva assintomática (ANI, asymptomatic neurocognitive impairment)</i>	Alteração de ≥ 2 domínios cognitivos na avaliação neuropsicológica, sem comprometimento funcional nas atividades da vida diária.
<i>Desordem neurocognitiva leve/moderada (MND, mild neurocognitive disorder)</i>	Alteração de ≥ 2 domínios cognitivos na avaliação neuropsicológica, com comprometimento funcional leve a moderado nas atividades da vida diária.
<i>Demência associada ao HIV (HAD, HIV associated dementia)</i>	Alterações graves de ≥ 2 domínios cognitivos, com comprometimento severo nas atividades da vida diária.

Fonte: Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV (2013). (52)

Até 10% dos indivíduos com as infecções precoce e aguda podem desenvolver sinais e sintomas neurológicos, porém os pacientes crônicos podem desencadear complicações neurológicas graves, como HAD.(8,27,53) Estudos iniciais propuseram que a presença do RNA do HIV no SNC estivesse correlacionada com HAD, levantando a questão de por que a disfunção cerebral causada pelo HIV, manifestava-se como HAD somente no final da inflamação e em apenas alguns indivíduos.(55,56)

No entanto, estudos recentes mostram que o HIV pode ser encontrado no SNC desde o início da infecção primária, permanecendo por toda essa fase da infecção. Na infecção primária, um alto grau de lesão do SNC pode se desenvolver a partir da infecção. Apesar de a maioria dos indivíduos não apresentar sintomas, mesmo na infecção primária pode ser estabelecido um processo inflamatório, associado ou não com lesão do SNC.(2,27,53,57) Durante a progressão da deficiência imunológica, e na presença de imunossupressão grave, essa lesão pode evoluir à irreversibilidade.(2,53) Os níveis de HIV no SNC presentes na infecção aguda podem variar, mas, via de regra, são menores que no plasma. (21)

Desse modo, a hipótese é que o dano cerebral diretamente induzido pelo vírus na

infecção precoce, evolui gradativamente e se manifesta como um curso polifásico de deficiência neuropsicológica, motivo pelo qual a HAD se manifesta em fases mais tardias da infecção.(58)

2.3 ANTIRRETROVIRAIS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A TARV desempenha um importante papel na diminuição da gravidade da lesão neuronal presente na infecção pelo HIV.(58) A incidência de HAD diminuiu substancialmente nas últimas duas décadas.(1) Ainda que não esteja direcionada diretamente para o SNC, geralmente, a TARV tem sido eficaz na supressão da carga viral do HIV-1 nesse compartimento e no compartimento periférico. No entanto, a replicação viral pode permanecer, mesmo com viremia no sangue estando abaixo do limite de detecção e mesmo que a TARV tenha sido introduzida precocemente. (3–7,59,60)

Apesar de que, tanto o início precoce da TARV, quanto o início tardio, possam ser preditores de HAND, quanto antes for o início do tratamento, melhor é o resultado na prevenção dessas neuropatologias, evitando-se o baixo nadir de CD4, que é considerado o principal fator de risco associado.(1,61,62) Outros fatores relacionados à supressão insuficiente do HIV no LCR são a baixa adesão dos pacientes à TARV e interrupções de tratamentos anteriores. (8,28,63–65) Uma possibilidade provável é que o reservatório viral no cérebro não esteja totalmente controlado, porém, a intensificação da terapia não parece ter impacto na replicação viral de baixo nível.(9)

Em um estudo realizado em 2010 por Canestri et al. (8) foram observados sintomas neurológicos e de escape viral no LCR apesar do tratamento suprimir o vírus no plasma. Edén e col. (9), nesse mesmo ano, relatam observações semelhantes a partir de uma série de pacientes com o sucesso no controle do HIV no plasma, documentando uma proporção surpreendentemente alta (10%) dos pacientes com o vírus ainda detectável no LCR, porém sem evidências de doença ativa do SNC.

Os resultados apresentados a partir de um estudo realizado por Peluso MJ et al. (2012)(63), demonstram uma elevada concentração do HIV no LCR, associada à uma variedade de sintomas neurológicos, incluindo deficiência cognitiva, sensorial e motora em pacientes com HIV suprimido no plasma por um período longo, e com estado imunológico preservado. O início das manifestações de comprometimento do SNC foi, na maioria das vezes, subagudo, variou em termos de gravidade e progrediu ao longo do tempo. Na maioria

das vezes refletiram um nível de debilitação significativa e envolveram uma série de domínios funcionais. (63)

No SNC, as drogas têm como alvo principal os macrófagos, porém, foi demonstrado que todos os fármacos, exceto os inibidores de protease, exibem atividade reduzida nessas células, em comparação com as células TCD4+. (66) Como consequência, podem ocorrer efeitos adversos nos neurônios, em função da toxicidade que ocorre na presença de altas concentrações de ARV. (67)

A replicação viral na presença desses ARV pode desencadear a emergência de vírus com mutações associadas com resistência, que, além de servir como fonte para disseminação sistêmica, falha terapêutica e podem ser considerados como fatores de desenvolvimento de doença neurológica. (8,63,68–72) Dessa forma, alcançar níveis terapêuticos de ARV no SNC é essencial para o controle da replicação viral nesse compartimento. (8–12)

2.4 ESCORE DE EFETIVIDADE DE PENETRAÇÃO NO SNC

A estimativa da eficácia da TARV no SNC pode influenciar na escolha do tratamento. Nesse contexto, Letendre e colaboradores (73), propuseram um modelo que sugere que possivelmente exista uma janela terapêutica para a concentração de ARV no SNC, abaixo da qual há replicação viral e, acima, efeitos neurotóxicos. (73)

O escore da efetividade de penetração dos ARVs no SNC (*CPE, CNS penetration effectiveness*) proposto por Letendre e colaboradores em 2008 (12) e atualizado em 2011 (73) é um método simples para calcular a eficácia dos regimes no SNC (Tabela 2). (12) Neste sistema, um ranking é definido, atribuindo hierarquicamente um valor de 1 (baixo) a 4 (alto) à cada ARV, com base em dados publicados sobre a eficácia no SNC, ou seja, o impacto na carga viral líquórica e a performance neurocognitiva, resultantes de estudos clínico (farmacodinâmica); as concentrações da droga no LCR (farmacocinética); e as características das drogas, por exemplo, a baixa ligação proteica, baixo peso molecular e maior solubilidade lipídica. Para a composição do esquema ARV, os valores atribuídos à cada droga são somados, definindo o valor de CPE. (73)

Tabela 2: Escore da efetividade de penetração dos antirretrovirais no sistema nervoso central (CPE).

	4 (melhor penetração)	3	2	1 (pior penetração)
ITRN^A	Zidovudina	Abacavir Emtricitabina	Didanosina Lamivudina Estavudina	Tenofovir Zalcitabina
ITRNN^B	Nevirapina	Delavirdina Efavirenz	Etravirina	
IP^C	Indinavir/r	Darunavir/r Fosamprenavir/r Indinavir Lopinavir/r	Atazanavir Atazanavir/r Fosamprenavir	Nelfinavir Ritonavir Saquinavir Saquinavir/r Tipranavir/r
Inibidores de fusão/ Entrada		Maraviroque		Enfuvirtida
Inibidores de Integrase		Raltegravir		

Adaptado de Letendre e col. (2011).(73) “/r” indica “potenciado com ritonavir”. ^AInibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos; ^BInibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeos; ^C Inibidores de Protease.

O fato de que alguns ARV possuem um baixo índice de CPE, permite a contínua replicação viral e suas consequências devastadoras. Nesse sentido, a maioria dos estudos publicados relatam uma associação entre regimes com maior CPE, diminuição da carga viral no LCR, melhores resultados neurocognitivos e uma melhor sobrevida, que ilustra a importância do uso de ARV com maior penetração no SNC.(12,73) Porém, não há um consenso quanto ao uso do CPE. (74–76)

O CPE não se baseia em evidências científicas robustas. A maior parte dos estudos que o suportam não é randomizado, nem prospectivo, além de possuírem diferenças no seu poder. Como resultado, não existe um padrão dos efeitos potenciais no SNC.(77) Entretanto, considerando a informação atualmente disponível na literatura, é sugerido pelas principais diretrizes de tratamento(1) que, indivíduos com doença no SNC, tenham esquemas com alto CPE. Adicionalmente, a composição do esquema deveria contemplar pelo menos 2 medicamentos com elevada penetração no SNC (escores 3 ou 4), incluindo preferencialmente um IP/r (Tabela 2). Em pacientes sem HAND, não existe evidência que demonstre o benefício de estruturar esquemas com medicamentos de elevada penetração no SNC. (1)

Existem relatos em outros estudos de nenhuma associação entre CPE e os resultados neurocognitivos, ou mesmo, a presença de algum dano aparente.(74–76) Em um estudo, foi

encontrado que o risco de demência foi maior em indivíduos com baixo CD4, que iniciaram tratamento com regimes com alto CPE.(78)

Um diagnóstico definitivo de distúrbios do SNC relacionados à infecção pelo HIV é dificultado por vários fatores.(79) A quantificação da carga viral ou próviral no LCR pode ser útil para o estabelecimento de um diagnóstico dos distúrbios do SNC relacionados à infecção pelo HIV, no controle ou cessação da replicação viral, além de poder influenciar na escolha do tratamento que mais se adapta ao paciente. (80,81)

2.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HIV

Desde a sua introdução na década de 1990, a medição da carga viral plasmática tornou-se essencial na gestão clínica da infecção pelo HIV-1.(82) Os métodos de quantificação da carga viral do HIV são utilizados como indicadores de prognóstico da infecção pelo HIV e da eficácia do tratamento com ARV, assim como ajudam também a monitorar a adesão a partir de amostras de plasma. (80–82) Quando utilizados em pesquisas clínicas com amostras de outros compartimentos corporais, como no LCR, os ensaios de carga viral auxiliam à prever resultados virológicos, como por exemplo, a persistência viral no SNC, todavia são realizados com base na metodologia descrita para plasma, por não possuir um método padronizado para esse tipo de amostra. (80,81)

O papel central desempenhado pela quantificação da carga viral aumentou consideravelmente a carga de trabalho do laboratório, tornando necessária uma melhoria tecnológica. O PCR em tempo real é o mais utilizado, pois oferece vantagens sobre os métodos moleculares tradicionais. Estas incluem (i) tempo de desempenho reduzido atribuído a tempo de ciclo reduzido, tamanho de *amplicon* reduzido e a eliminação de uma etapa adicional necessária para a detecção de produto; (ii) sensibilidade aumentada como resultado do emprego de métodos de detecção de fluorescência; (iii) diminuição da contaminação por transição devido ao uso de um sistema fechado para amplificação e detecção; E (iv) maior amplitude dinâmica. Outras melhorias foram conseguidas pela introdução de extrações automatizadas de ácido nucleico, resultando em testes completamente automatizados com um tempo de resposta médio de 2 h. (83–85)

2.6 ESCOLHA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE(86)

O Ministério da Saúde permite o acesso da população à testes de carga viral do HIV, levando em consideração a viabilidade e a relação custo-benefício na ampliação dos locais de atendimento que oferecem a testagem, especialmente, considerando os recursos limitados disponíveis no país. É disponibilizado um manual para servir como ponto de referência para os países implementarem ou ampliarem a capacidade dos testes existentes, na tentativa de desenvolver uma rede robusta e sustentável de testes de carga viral do HIV. Para garantir a escolha mais adequada na seleção do método à ser utilizado visando o gerenciamento dos recursos, consideram-se requisitos técnicos para realizar o teste, a logística do transporte das amostras e o custo. (86)

Embora as tecnologias atuais de carga viral compartilhem características técnicas comuns, diferenciam-se em termos de princípio de teste, capacidade de produção de amostra, custos, infra-estrutura, recursos humanos necessários e capacidade de usar manchas de sangue seco coletadas de indivíduos experimentados com TARV. Esses fatores são computados na seleção do método de quantificação viral. A escolha também baseia-se em especificidades do tipo de amostra e considerações operacionais, como a eficiência do sistema de transporte de amostras, os volumes necessários para os ensaios, os recursos humanos e os recursos técnicos. Por fim, dentre as considerações para a determinação de custos dos testes, são incluídos o custo do equipamento auxiliar, as mudanças de infra-estrutura necessárias, os materiais consumíveis, os controles padrões a serem utilizados, o material de garantia de qualidade, os contratos de manutenção, o tempo de necessidade de pessoal para operar os testes, o aluguel de reagentes, os preços do consórcio e o preço das múltiplas plataformas para comparação. (86)

As seguintes plataformas de carga viral baseadas em laboratório comercialmente disponíveis são capazes de medir a carga viral de HIV (RNA ou ácidos nucleicos totais): COBAS® TaqMan® (Roche Molecular Systems), Abbott RealTime m2000rt (Abbott Molecular), NucliSENS EasyQ® (bioMérieux), VERSANT® kPCR (Siemens Healthcare Diagnostics), Generic HIV Viral Load (Biocentric), VERSANT HIV RNA 3.0 Ensaio (bDNA), artus® HI Virus-1 RG RT-PCR e artus® HI Virus-1 QS-RGQ Kit QIAGEN). Destes, os mais amplamente utilizados incluem o COBAS® TaqMan® e o Abbott RealTime m2000rt, os quais são semelhantes no quesito “tecnologia molecular de ponta”, mas

diferem em todos os outros aspectos, como na extração, no alvo dos iniciadores, na sequência alvo e no método de quantificação. (19,86) No entanto, no Brasil, o método atual que superou os métodos comercialmente disponíveis, com relação às orientações práticas que delineiam os critérios à serem considerados na seleção e implementação dos ensaios de carga viral do HIV no mundo, foi o Abbott m2000 RealTime HIV-1 (referido como m2000). (20)

2.7 ENSAIO ABBOTT M2000 REALTIME HIV-1 (20)

O método “Abbott m2000 RealTime HIV-1” é um ensaio *in vitro* de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para quantificação do HIV-1 em tempo real no plasma de indivíduos infectados pelo HIV-1 que utiliza a técnica de RT-PCR para gerar um produto amplificado a partir do genoma de RNA do HIV-1 em amostras clínicas. (20)

Esse método possui um sistema que automatiza uma variedade de etapas de processamento manual, como a pipetagem, o que ajuda a reduzir o tempo necessário para preparar amostras de pacientes. (20) O sistema m2000 consiste de dois instrumentos: o m2000sp (extração automatizada) e o instrumento m2000rt (PCR em tempo real), que amplifica e detecta o ácido nucléico do HIV-1 usando um único DNA linear de cadeia dupla. (20,87,88)

O RNA é extraído a partir de 0,6 mL de plasma utilizando a tecnologia de micropartículas magnéticas. Ele é isolado e adicionado manualmente à mistura principal preparada, seguida pela amplificação por PCR em tempo real. A transcrição reversa, a amplificação por PCR e as reações de detecção/quantificação são realizadas na plataforma Abbott m2000rt. O intervalo de quantificação de RNA de HIV-1 do ensaio é de 40 - 10.000.000 cp/mL. (20,89)

Durante a reação de amplificação, o RNA-alvo é convertido em cDNA pela atividade de transcriptase reversa da enzima termoestável rTth DNA polimerase. A quantidade da sequência-alvo de HIV-1 presente em cada ciclo de amplificação é medida com o uso de sondas de oligonucleotídeos marcados por fluorescência no sistema m2000rtTM. (20)

A sonda consiste em dois fragmentos de DNA de comprimentos diferentes: o fragmento mais longo é complementar ao DNA alvo e é ligado a um marcador fluorescente, enquanto que o fragmento mais curto contém a molécula de desativação. Quando o DNA alvo não está presente, a sonda longa liga-se à sonda de desativação e não é detectada fluorescência; Quando o DNA alvo está presente, a sonda longa se liga preferencialmente ao

DNA alvo e é capaz de fluorescer dando um sinal quantificável. A vantagem da utilização destas sondas é a sua tolerância aumentada à discrepâncias, que é particularmente útil para vírus, tais como HIV, que são altamente mutáveis. (20,87–89)

A concentração de RNA do HIV-1 em amostras é calculada a partir da curva de calibração armazenada e os resultados são reportados automaticamente na estação de trabalho m2000rt. Os resultados do ensaio podem ser relatados em cópias/mL (cp/mL), \log_{10} cp/mL, Unidades Internacionais (UI)/mL, ou \log_{10} UI/mL; (1 UI = 0,58 cópias, 1 cópia = 1,74 UI). (20)

Este ensaio permite quatro opções de volume de amostras: 0,2 mL, 0,5 mL, 0,6 mL e 1,0 mL. Usando 0,6 mL de volume de amostra, o intervalo linear é de 40 – 10.000.000 cp/mL ($1.6 \log_{10}$ cp/mL - $7.0 \log_{10}$ cp/mL). A especificidade do ensaio é de 100% (IC 95%; 99,28 - 100%). A sensibilidade para este volume com limite de detecção de 40 cp/mL é 100%. O m2000rt demonstra alta precisão em torno do ponto de decisão clínica e minimiza o risco de relatar um resultado de baixo nível de viremia devido ao erro aleatório. (20)

2.8 ENSAIO COBAS® AMPLIPREP/ COBAS® TAQMAN® 48 HIV-1, version 2 (18)

O ensaio “COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 HIV-1, version 2” foi desenvolvido pela Roche Diagnostic Systems e trata-se de um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*, totalmente automatizado. A preparação das amostras é realizada pelo equipamento COBAS® AmpliPrep ao passo que a amplificação e detecção do RNA são processadas no Analisador COBAS® TaqMan® 48.

A técnica baseia-se em três processos principais: preparação das amostras (extração de RNA viral), transcrição reversa e PCR em tempo real. Como controle e para homogeneizar os resultados é usado um controle interno da reação, designado por Produto de Quantificação (PQ), que consiste numa sequência de RNA não infecciosa que contém sequências do HIV com primers de ligação idênticos aos do RNA do HIV alvo e uma região única de ligação de sonda que permite que o “amplicon” do PQ se distinga do “amplicon” alvo. Este controle é incorporado em cada amostra e submetido a todo o processo.

A preparação automatizada da amostra é realizada inicialmente a partir de 1mL de soro do paciente por uma técnica de captura à base de sílica. Simultaneamente processam-se aproximadamente 850 μ L de controle positivo com níveis elevados do HIV, 850 μ L de controle positivo com baixos níveis do HIV e 850 μ L de controle negativo de plasma. As

partículas virais são lisadas e os ácidos nucleicos liberados durante a incubação a temperaturas elevadas com uma protease e tampão caotrópico. As amostras são depois transferidas para o Analisador COBAS® TaqMan® 48.

A transcrição reversa e amplificação são efetuadas com a enzima termoestável recombinante, *Thermus specie DNA polimerase* (Z05). A Z05 possui atividade simultânea de transcriptase reversa e de polimerase de DNA.

O uso de sondas fluorescentes duplamente marcadas (TaqMan®) possibilita a detecção em tempo real do acúmulo de produtos de PCR pelo monitoramento e registro da emissão de fluorescência. As sondas consistem em sondas oligonucleotídicas específicas para o HIV alvo e para o PQ. As sondas do HIV alvo e do PQ estão marcadas com substâncias que emitem diferentes fluorescências. As condições do processo de amplificação e quantificação da carga viral realizam-se de acordo com as indicações do fabricante.

O analisador COBAS® TaqMan® 48 calcula a concentração de RNA do HIV presente nas amostras, comparando o sinal do HIV com o sinal do PQ em cada amostra e controle. A análise dos resultados é feita pelo programa informático AMPLILINK® (versão 3.2.2).

O intervalo linear é de 20 – 10.000.000 cp/mL ($33 - 1,67 \times 10^7$ UI/mL). Uma cópia de RNA do HIV-1 é equivalente a 1,67 UI. O fator de conversão relatado entre RNA do HIV-1 em cp/mL e as UI/ml de HIV-1 foi determinada pela Roche Molecular Systems, Inc. em 0,6 cp/UI (1,67 UI/cp). O limite de detecção é de 20 log₁₀ cp/mL com Análise Probit com taxa de acertos > 95% ou de 33 UI/mL. A especificidade clínica foi de 99,3% (IC 95%; 98,2% - 99,8%) e a sensibilidade de 100,0% (99,1% - 100,0%).

2.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS ABBOTT REALTIME M2000 HIV-1 E COBAS® AMPLIPREP/ COBAS® TAQMAN® 48 HIV-1, version 2; ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEMS

O HIV-1 é caracterizado por uma ampla heterogeneidade, o que tende a dificultar a confiabilidade da detecção e da exatidão dos ensaios de quantificação do RNA de HIV-1. (90) Com a sensibilidade melhorada vem a preocupação com o aumento da frequência de viremia de baixo nível que está sendo detectada e as implicações que isso pode ter para o manejo clínico. (91)

Os ensaios mais recentes oferecem uma melhor sensibilidade na detecção viral: o COBAS v2.0 oferece um menor limite de detecção (20 cópias/mL) que o m2000rt (40

cp/mL). No entanto, os resultados com intervalos menos amplos entre os valores de carga viral, ou seja, mais distantes do limite de detecção do método de PCR em tempo real, podem traduzir-se na necessidade de mais repetições de testes e maiores custos para amostras com carga viral mais elevada.

Embora geralmente estes ensaios apresentem resultados relativamente comparáveis (92), o seu fabricante relata que a variação e o erro tendem a aumentar nos limites inferiores de quantificação dos ensaios. Múltiplos estudos têm documentado a variação entre estes ensaios quando se medem amostras com baixos níveis de carga viral. (58,93–100) Os resultados terapêuticos demonstram ser influenciados pela viremia de baixo nível em alguns estudos, no entanto, a relevância clínica global da viremia de baixo nível permanece controversa. Mesmo assim, a elevada variabilidade em torno do limiar de detecção dos ensaios de carga viral deve ser observada, uma vez que muitos pacientes têm cargas virais neste nível, o que torna difícil a definição precisa da viremia.(95,101–103)

Os blips virais são descritos como detecções transitórias de carga viral tipicamente abaixo de 200 cp/mL, que retornam para níveis indetectáveis, sem qualquer alteração na TARV.(104) Títulos baixos de RNA de HIV podem ser relatados como indetectáveis por um ensaio, detectáveis mas menores do que o limite de detecção por um segundo ensaio e, ao mesmo tempo, relatados como um valor quantitativo por um terceiro ensaio que apresente uma sensibilidade aumentada.

Tanto a não detecção como a subquantificação da viremia do HIV-1, particularmente na faixa dinâmica mais baixa dos ensaios de carga viral, têm o potencial de gerar condutas clínicas sobre o uso ou alterações na TARV de forma inadequada.(19) Ou seja, quantificações virais intermitentes de baixo nível podem ser mal interpretadas como falha virológica ocasionando modificações na TARV.

Em laboratórios que alteraram a metodologia padrão de quantificação do método m200rt ao COBAS v2.0, observou-se um aumento dos resultados qualitativa e quantitativamente detectados.(105) Em estudos que relataram resultados de diferentes ensaios de quantificação da carga viral do HIV, foi observado que, em se tratando do método COBAS v2.0, as contagens de carga viral foram superestimadas entre 0,04–0,33 log₁₀ cp/mL com relação aos outros métodos.(88,106–108) O m2000rt, por sua vez, tanto super como subestimou os valores de carga viral do HIV, porém, com exceção de um estudo(108), nunca acima de 0,5 log₁₀/mL (Padrão Internacional da Organização Mundial da Saúde - OMS) considerado como ausente de significado clínico) (88,106–109). Finalmente, quando comparados diretamente ao Padrão Internacional da OMS, nem o m2000rt, nem o COBAS

v2.0 diferiram em mais de 0,5 \log_{10} , sendo que o m2000rt mostrou ligeira superestimação, e o COBAS v2.0, ligeira subestimação da carga viral do HIV. (109) Tais resultados são consistentes com os relatados por van Rensburg et al., que demonstra a subnotificação pelo ensaio m2000rt ao padrão, como sendo de 0,2 a 0,3 \log_{10} cp/mL, enquanto pelo COBAS v2.0, o padrão foi excedido entre 0,17 a 0,31 \log_{10} cp/mL.(109) Isto demonstra a importância de se utilizar uma plataforma de ensaio padrão para monitorizar dados longitudinais para um dado sujeito.

O método m2000rt possui um ótimo custo-benefício associado por teste, pois, com o sistema totalmente automatizado, é capaz de executar 96 testes durante um tempo de execução de 6 horas de forma simultânea. O COBAS v2.0 também permite a execução dos testes no período de 6 horas, todavia, realiza metade da quantidade de testes (48 testes) que o método da Abbott. Com relação ao tempo de preparação da amostra, o COBAS v2.0 tem um tempo mais longo que o m2000rt.(110)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Comparar os ensaios m2000rt, produzido pela Abbott, e o COBAS v2.0, desenvolvido pela Roche, considerando a detecção da carga viral do HIV-1 no líquor, para que o método de melhor custo-benefício, o m2000rt, possa ser amplamente utilizado nesse contexto.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar a correlação e a concordância do método m2000rt em comparação com o método COBAS v2.0, o qual será usado como referência nas análises, na quantificação da carga viral no LCR.

4 JUSTIFICATIVA

Esse estudo foi realizado a partir de um estudo piloto prévio que demonstrou ser justificável o investimento em um estudo com um tamanho de amostra suficiente para obter confiabilidade nos resultados demonstrados pelo piloto (os métodos foram concordantes com um viés de $0,183 \pm 0,349$; IC 95% = $-0,018 - 0,384$ não significativo ($p= 0,071$) e com limites de concordância de LCS = $0,87$; IC 95% = $0,54 - 1,20$, e LCI = $-0,51$; IC 95% = $-0,18 - -0,84$, para um $n=14$).

Levando em consideração que não existe uma metodologia padronizada para detecção do HIV no líquido e que o método COBAS v2.0 é o mais amplamente utilizado nesse contexto em pesquisas clínicas, permitir a utilização, como método alternativo, do ensaio m2000rt, um método eficiente e que possui um baixo custo, é essencial para a ampliação do acesso à detecção do HIV no compartimento cerebral, permitindo, assim, que a busca da erradicação seja intensificada, uma vez que a eliminação deste reservatório é uma parte considerável desse processo.

5 REFERÊNCIAS

1. Saúde M da. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA O MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV. Ministério da Saúde Secr Vigilância em Saúde Dep DST, Aids e Hepatites Virais. 2013;222.
2. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Woods SP, Ake C, Vaida F, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: Charter Study. *Neurology*. 2010;75(23):2087–96.
3. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J virus Erad*. 2015;1(2):59–66.
4. Sáez-Ciri3n A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog*. 2013;9(3).
5. Chun T-W, Moir S, Fauci AS. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nat Immunol* [Internet]. 19 de maio de 2015 [citado 16 de fevereiro de 2017];16(6):584–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3152>
6. Yilmaz A, Price RW, Spudich S, Fuchs D, Hagberg L, Gissl3n M. Persistent intrathecal immune activation in HIV-1-infected individuals on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;47(2):168–73.
7. Price RW, Peterson J, Fuchs D, Angel TE, Zetterberg H, Hagberg L, et al. Approach to cerebrospinal fluid (CSF) biomarker discovery and evaluation in HIV infection. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(5):1147–58.
8. Canestri A, Lescure FF-X, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, Marcelin AGG, et al. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. mar3o de 2010 [citado 16 de fevereiro de 2017];50(5):773–8. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/650538>
9. Ed3n A, Fuchs D, Hagberg L, Nilsson S, Spudich S, Svennerholm B, et al. HIV-1 Viral Escape in Cerebrospinal Fluid of Subjects on Suppressive Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis* [Internet]. 15 de dezembro de 2010 [citado 13 de fevereiro de 2017];202(12):1819–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050117>
10. Gisolf EH, Enting RH, Jurriaans S, de Wolf F, van der Ende ME, Hoetelmans RM, et al. Cerebrospinal fluid HIV-1 RNA during treatment with ritonavir/saquinavir or ritonavir/saquinavir/stavudine. *AIDS* [Internet]. 2000;14(11):1583–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983645>
11. Cusini A, Vernazza PL, Yerly S, Decosterd L a, Ledergerber B, Fux C a, et al. Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2013;62(1):28–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135736> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018371>
12. Letendre S, Marquie-beck J, Capparelli E, Best B, Mccutchan JA, Morgello S, et al. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness Rank for Quantifying Antiretroviral Penetration Into the Central Nervous System. 2008;65(1):65–70.
13. Clifford DB. Viral Escape in Cerebrospinal Fluid—An Achilles Heel of HIV Therapy? *J Infect Dis* [Internet]. 15 de dezembro de 2010 [citado 6 de fevereiro de 2017];202(12):1768–9. Available at: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/657343>
14. Stephan C, Hill A, Hadacek MB, van Delft Y, Moecklinghoff C. Performance of the Abbott RealTime HIV-1 assay versus the Roche Amplicor HIV-1 Monitor™ Test, v1.5, UltraSensitive assay for samples with low plasma HIV-1 RNA copy numbers. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de junho de 2014 [citado 13 de fevereiro de 2017];69(6):1708–10. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt538>

15. cobas® TaqMan® HIV-1 Test v2 | Roche Molecular Diagnostics [Internet]. [citado 13 de fevereiro de 2017]. Available at: <https://molecular.roche.com/assays/cobas-taqman-hiv-1-test-v2-for-use-with-the-high-pure-system/>
16. Molecular Diagnostic Assays | Roche Molecular Diagnostics [Internet]. [citado 13 de janeiro de 2017]. Available at: <https://molecular.roche.com/solutions/assays/>
17. Béguelin C, Vázquez M, Bertschi M, Yerly S, de Jong D, Rauch A, et al. Viral escape in the CNS with multidrug-resistant HIV-1. *J Int AIDS Soc* [Internet]. 2014;17(4 Suppl 3):19745. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4225423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Delille CA, Pruetz ST, Marconi VC, Lennox JL, Armstrong WS, Arrendale RF, et al. Effect of protein binding on unbound atazanavir and darunavir cerebrospinal fluid concentrations. *J Clin Pharmacol* [Internet]. setembro de 2014 [citado 16 de fevereiro de 2017];54(9):1063–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691856>
19. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. janeiro de 2011 [citado 8 de fevereiro de 2017];49(1):118–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084515>
20. RealTime HIV-1 Viral Load Assay | Abbott Molecular [Internet]. [citado 13 de janeiro de 2017]. Available at: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/realtime-hiv-1-viral-load>
21. Valcour V, Chalermchai T, Sailasuta N, Marovich M, Lerdlum S, Suttichom D, et al. Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *J Infect Dis*. 2012;206(2):275–82.
22. da Fonseca ACC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014;8:362. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404894> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4217497>
23. Zhang YL, Ouyang YB, Liu LG, Chen DX. Blood-brain barrier and neuro-AIDS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(24):4927–39.
24. Atluri VSR, Hidalgo M, Samikkannu T, Kurapati KRV, Jayant RD, Sagar V, et al. Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: an update. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015;9(June):212. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00212/abstract>
25. Burdo TH, Lackner A, Williams KC. Monocyte/Macrophages And Their Role In Hiv Neuropathogenesis. *Immunol Rev*. 2013;254(1):102–13.
26. Spudich S, Gisslen M, Hagberg L, Lee E, Liegler T, Brew B, et al. Central nervous system immune activation characterizes primary human immunodeficiency virus 1 infection even in participants with minimal cerebrospinal fluid viral burden. *J Infect Dis*. 2011;204(5):753–60.
27. Pilcher CD, Shugars DC, Fiscus S a, Miller WC, Menezes P, Giner J, et al. HIV in body fluids during primary HIV infection: implications for pathogenesis, treatment and public health. *AIDS* [Internet]. 2001;15(7):837–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399956>
28. Abbas Abul K., Lichtman; AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 8^a ed., Elsevier. 2014. 544 p.
29. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000;18(Figure 1):767–811. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837075>
30. Bagashev A, Sawaya BE. Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview. *Virology* [Internet]. 2013;10:358. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3879180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Li W, Li G, Steiner J, Nath A. Role of Tat protein in HIV neuropathogenesis. Vol. 16, *Neurotoxicity Research*. 2009. p. 205–20.

32. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* [Internet]. 2005;4(3):281–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101534>
33. Saha RN, Pahan K. Tumor necrosis factor-alpha at the crossroads of neuronal life and death during HIV-associated dementia. *J Neurochem*. 2003;86(5):1057–71.
34. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):569–81.
35. Hoeffel G, Ginhoux F. Ontogeny of tissue-resident macrophages. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. 2015.
36. Elbirt D, Mahlab-Guri K, Bezalel-Rosenberg S, Gill H, Attali M, Asher I. HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). *Isr Med Assoc J* [Internet]. 2015;17(1):54–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739180>
37. Lambotte O, Deiva K, Tardieu M. HIV-1 persistence, viral reservoir, and the central nervous system in the HAART era. *Brain Pathol* [Internet]. 5 de abril de 2003 [citado 3 de maio de 2017];13(1):95–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12580549>
38. Enting RH, Hoetelmans RMW, Lange JMA, Burger DM, Beijnen JH, Portegies P. Antiretroviral drugs and the central nervous system. *AIDS* [Internet]. 1998 [citado 3 de maio de 2017];12(15):1941–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814862>
39. Antinori A, Cingolani A, Giancola ML, Forbici F, De Luca A, Perno CF. Clinical implications of HIV-1 drug resistance in the neurological compartment. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 8 de dezembro de 2003 [citado 3 de maio de 2017];35(sup106):41–4. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008870310009650>
40. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(July):428–35.
41. Zhang L, Chung C, Hu BS, He T, Guo Y, Kim AJ, et al. Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest*. 2000;106(7):839–45.
42. Barouch DH, Deeks SG. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. *Science* [Internet]. 2014;345(6193):169–74. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/345/6193/169.long>
43. Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*. 2010;16(4):460–5.
44. Hatano H, Strain MC, Scherzer R, Bacchetti P, Wentworth D, Hoh R, et al. Increase in 2-long terminal repeat circles and decrease in D-dimer after raltegravir intensification in patients with treated HIV Infection: A randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis*. 2013;208(9):1436–42.
45. Kaul M. HIV's double strike at the brain: neuronal toxicity and compromised neurogenesis. *Front Biosci* [Internet]. 2008;13:2484–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3432272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Rumbaugh J a, Nath A. Developments in HIV neuropathogenesis. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2006;12(9):1023–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16515484>
47. Watkins CC, Treisman GJ. Cognitive impairment in patients with AIDS - prevalence and severity. *HIV AIDS (Auckl)* [Internet]. 2015;7:35–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678819%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4319681>
48. Cebrian C, Zucca FA, Mauri P, Steinbeck JA, Studer L, Scherzer CR, et al. MHC-I expression renders catecholaminergic neurons susceptible to T-cell-mediated degeneration. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5:3633. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736453%5Cnhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024461/pdf/nihms575217.pdf>
49. Chevalier G, Suberbielle E, Monnet C, Duplan V, Martin-Blondel G, Farrugia F, et al. Neurons are MHC class I-Dependent Targets for CD8 t cells upon neurotropic viral infection. *PLoS Pathog*. 2011;7(11).
50. González-Scarano F, Martín-García J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*.

- 2005;5(January):69–81.
51. Price RW. Neurological complications of HIV infection. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1996;348(9025):445–52. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673695110356>
 52. Saúde M da M, Vigilância S De, Costa AR, Girade R, Costa AR. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES. Ministério da Saúde Secr Vigilância em Saúde Dep DST, Aids e Hepatites Virais. 2013;29(3):555–62.
 53. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. Vol. 69, *Neurology*. 2007. p. 1789–99.
 54. Saúde M da. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES. Ministério da Saúde Secr Vigilância em Saúde Dep DST, Aids e Hepatites Virais. 2013;29(3):555–62.
 55. Price RW, Zink MC, Clements JE. The two faces of HIV infection of cerebrospinal fluid. *Trends Microbiol*. 2000;8(9):387–90.
 56. Brew BJ, Robertson K, Wright EJ, Churchill M, Crowe SM, Cysique LA, et al. HIV eradication symposium: will the brain be left behind? *J Neurovirol* [Internet]. 7 de junho de 2015 [citado 26 de abril de 2017];21(3):322–34. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13365-015-0322-6>
 57. Peluso MJ, Meyerhoff DJ, Price RW, Peterson J, Lee E, Young AC, et al. Cerebrospinal Fluid and Neuroimaging Biomarker Abnormalities Suggest Early Neurological Injury in a Subset of Individuals During Primary HIV Infection. 2013;207:1703–12.
 58. Geretti AM, Tong W, Fox Z, Labbett W, O’Shea S, Chrystie I SE. The Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 version 2.0 assay for HIV-1 RNA load measurement in plasma shows improved detection of non-B subtypes and increased levels of detection and reporting. *HIV Med*. 2009;10(Suppl 2(PE20.6/1)):45–221.
 59. Lint CMC Van, Rohr O, Schwartz C. Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure. 2016;7(September):1–13.
 60. Price RW, Spudich S. Antiretroviral Therapy and Central Nervous System HIV Type 1 Infection. 2008;94117(Suppl 3).
 61. Zambuzi FA, Cacemiro M, Fontanari C, Bollela VR, Frantz FG. Original article Classical and alternative macrophages have impaired function during acute and chronic HIV-1 infection. 2016;(x x):1–9.
 62. Letendre SL, Ellis RJ, Ances BM, McCutchan JA. Neurologic complications of HIV disease and their treatment. *Top HIV Med A Publ Int AIDS Soc USA* [Internet]. 2010;18(2):45–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516524>
 63. Peluso MJ, Ferretti F, Peterson J, Lee E, Fuchs D, Boschini A, et al. Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral load. *AIDS* [Internet]. setembro de 2012 [citado 16 de fevereiro de 2017];26(14):1765–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22614889%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3881435>
 64. Bingham R, Ahmed N, Rangi P, Johnson M, Tyrer M, Green J. HIV encephalitis despite suppressed viraemia: a case of compartmentalized viral escape. *Int J STD AIDS*. 2011;22:608–9.
 65. Boucher CAB, Nijhuis M, Van Maarseveen NM. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: Evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. Vol. 189, *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009. p. 299–320.
 66. Gavegnano C, Schinazi RF. Antiretroviral therapy in macrophages: Implication for HIV eradication. Vol. 20, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 2009. p. 63–78.
 67. Robertson K, Liner J, Meeker RB. Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol*. 2012;18(5):388–99.
 68. Joseph SB, Arrildt KT, Sturdevant CB, Swanstrom R. HIV-1 target cells in the CNS. *J Neurovirol*. 2014;21(3):276–89.
 69. Dahl V, Gisslen M. An example of genetically distinct HIV-1 variants in cerebrospinal fluid and plasma during suppressive therapy. *J Infect ...* [Internet]. 2013; Available at:

- <http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2013/12/12/infdis.jit805.short>
70. Dahl V, Peterson J, Fuchs D, Gisslen M, Palmer S, Price RW. Low levels of HIV-1 RNA detected in the cerebrospinal fluid after up to 10 years of suppressive therapy are associated with local immune activation. *AIDS* [Internet]. 24 de setembro de 2014 [citado 6 de fevereiro de 2017];28(15):2251–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4492794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 71. Lescure FX, Moulignier A, Savatovsky J, Amiel C, Carcelain G, Molina JM, et al. CD8 encephalitis in HIV-infected patients receiving cART: A treatable entity. *Clin Infect Dis*. 2013;57(1):101–8.
 72. Licht A, Alter G. A Drug-Free Zone-Lymph Nodes as a Safe Haven for HIV. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(3):275–6. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816300592%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962938>
 73. Letendre S. Letendre 2011 HAND and HAART. *Top Antivir Med* [Internet]. 2011;19(4):137–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156215>
 74. Vassallo M, Durant J, Biscay V, Lebrun-Frenay C, Dunais B, Laffon M, et al. Can high central nervous system penetrating antiretroviral regimens protect against the onset of HIV-associated neurocognitive disorders? *AIDS* [Internet]. 2014;28(4):493–501. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002030-201402200-00005>
 75. Ciccarelli N, Fabbiani M, Di Giambenedetto S, Fanti I, Baldonero E, Bracciale L, et al. Efavirenz associated with cognitive disorders in otherwise asymptomatic HIV-infected patients. *Neurology*. 2011;76(16):1403–9.
 76. Marra CM, Zhao Y, Clifford DB, Letendre S, Evans S, Henry K, et al. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS* [Internet]. 2009;23(11):1359–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2706549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 77. Libertone R, Lorenzini P, Balestra P, Pinnetti C, Ricottini M, Plazzi MM, et al. Central nervous system penetration-effectiveness rank does not reliably predict neurocognitive impairment in HIV-infected individuals. *J Int AIDS Soc*. 2014;17(4 Suppl 3):19655.
 78. Caniglia EC, Cain LE, Justice A, Tate J, Logan R, Sabin C, et al. Antiretroviral penetration into the CNS and incidence of AIDS-defining neurologic conditions. 2014;
 79. Rosadas C, Puccioni-Sohler M. Relevance of retrovirus quantification in cerebrospinal fluid for neurologic diagnosis. *J Biomed Sci* [Internet]. 8 de agosto de 2015 [citado 6 de fevereiro de 2017];22(1):66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26253430>
 80. Mellors JW, Muñoz A, Giorgi J V., 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(12):946–54.
 81. Mylonakis E, Paliou M, Rich JD. Plasma viral load testing in the management of HIV infection. *Am Fam Physician* [Internet]. 2001;63(3):483–90, 495–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272298>
 82. Holodniy M, Katzenstein DA, Sengupta S, Wang AM, Casipit C, Schwartz DH, et al. Detection and Quantification of Human Immunodeficiency Virus RNA in Patient Serum by Use of the Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis* [Internet]. 1991;163(4):862–6. Available at: <http://jid.oxfordjournals.org/content/163/4/862%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010639>
 83. Bankowski J, Ph D, Anderson SM, Lubcorp VL. Real-Time Nucleic Acid Amplification in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Newsl*. 2004;26(2):9–15.
 84. T.F. S, J.R. U, M.J. E, L.M. S, E.A. V, M.F. J, et al. Development, implementation, and trend analysis of real-time PCR tests for the clinical microbiology laboratory [Internet]. Vol. 26, *Clinical Microbiology Newsletter*. 2004. p. 145–53. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&NEWS=N&AN=2004414260>
 85. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future

- applications in acute-care settings. Vol. 4, *Lancet Infectious Diseases*. 2004. p. 337–48.
86. World Health Organization. Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing: Interim technical update. *Who* [Internet]. 2014;(July):28. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128121/1/9789241507578_eng.pdf?ua=1&ua=1
 87. Swanson P, Holzmayer V, Huang S, Hay P, Adebisi A, Rice P, et al. Performance of the automated Abbott RealTime™ HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from London: Comparison to VERSANT HIV-1 RNA 3.0, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, and LCx® HIV RNA Quantitative assays. *J Virol Methods* [Internet]. novembro de 2006 [citado 6 de fevereiro de 2017];137(2):184–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876263>
 88. Scott LE, Noble LD, Moloi J, Erasmus L, Venter WDF, Stevens W. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS Easy. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2209–17.
 89. Tang N, Huang S, Salituro J, Mak W-BB, Cloherty G, Johanson J, et al. A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. *J Virol Methods* [Internet]. dezembro de 2007 [citado 6 de fevereiro de 2017];146(1–2):236–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707519>
 90. Garcia-Diaz A, Clewley GS, Booth CL, Labett W, McAllister N, Geretti AM. Comparative evaluation of the performance of the Abbott real-time human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for measurement of HIV-1 plasma viral load following automated specimen preparation. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006;44(5):1788–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672408>
 91. Gueudin M, Plantier JC, Lemée V, Schmitt MP, Chartier L, Bourlet T, et al. Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime extraction-quantification systems for HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. abril de 2007 [citado 29 de abril de 2017];44(5):500–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259908>
 92. Oliver AR, Pereira SF, Clark DA. Comparative Evaluation of the Automated Roche TaqMan Real-Time Quantitative Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA PCR Assay and the Roche AMPLICOR Version 1.5 Conventional PCR Assay. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1 de novembro de 2007;45(11):3616–9. Available at: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00221-07>
 93. Naeth G, Ehret R, Wiesmann F, Braun P, Knechten H, Berger A. Comparison of HIV-1 viral load assay performance in immunological stable patients with low or undetectable viremia. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 15 de fevereiro de 2013 [citado 17 de fevereiro de 2017];202(1):67–75. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-012-0249-y>
 94. 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* [Internet]. dezembro de 2010 [citado 17 de fevereiro de 2017];49(4):249–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.08.016>
 95. Ruelle J, Debaisieux L, Vancutsem E, Bel A De, Delforge M, Piérard D, et al. HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability. *BMC Infect Dis* [Internet]. 24 de dezembro de 2012;12(1):100. Available at: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-12-100>
 96. Amendola A, Milia MG, Ghisetti V, Brega C, Zaccaro P, Capobianchi MR. Accuracy of a Commercial Real-Time Polymerase Chain Reaction–Based System for Measurement of HIV RNA Levels around the Limit of Quantification of the Assay. *Clin Infect Dis* [Internet]. junho de 2009;48(11):1630–1. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/598990>
 97. Damond F, Roquebert B, Benard A, Collin G, Miceli M, Yeni P, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Plasma Load Discrepancies between the Roche COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Version 1.5 and the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Assays. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1 de outubro de 2007;45(10):3436–8. Available at: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00973-07>
 98. Karasi JC, Dziezuk F, Quennessy L, Förster S, Reischl U, Colucci G, et al. High correlation between the Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *J Clin Virol* [Internet]. novembro de 2011;52(3):181–6. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653211002770>

99. Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L, Icard V, Saoudin H, Traub-Rothberg F, et al. HIV-1 Load Comparison Using Four Commercial Real-Time Assays. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1 de janeiro de 2011;49(1):292–7. Available at: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01688-10>
100. Jennings C, Harty B, Granger S, Wager C, Crump JA, Fiscus SA, et al. Cross-Platform Analysis of HIV-1 RNA Data Generated by a Multicenter Assay Validation Study with Wide Geographic Representation. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1 de agosto de 2012;50(8):2737–47. Available at: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00578-12>
101. Delaugerre C, Gallien S, Flandre P, Mathez D, Amarsy R, Ferret S, et al. Impact of Low-Level-Viremia on HIV-1 Drug-Resistance Evolution among Antiretroviral Treated-Patients. *Sluis-Cremer N*, organizador. *PLoS One* [Internet]. 10 de maio de 2012;7(5):e36673. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036673>
102. Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A, et al. Plasma HIV-1 RNA Detection Below 50 Copies/mL and Risk of Virologic Rebound in Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1 de março de 2012;54(5):724–32. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir936>
103. Verhofstede C, Van Wanzele F, Van Der Gucht B, Pelgrom J, Vandekerckhove L, Plum J, et al. Detection of drug resistance mutations as a predictor of subsequent virological failure in patients with HIV-1 viral rebounds of less than 1,000 RNA copies/ml. *J Med Virol* [Internet]. setembro de 2007;79(9):1254–60. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.20950>
104. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: A comparative study. Vol. 173, *Journal of Virological Methods*. 2011.
105. Karasi JC, Dziezuk F, Quennery L, Förster S, Reischl U, Colucci G, et al. High correlation between the Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *J Clin Virol* [Internet]. 2011 [citado 22 de maio de 2017];52(3):181–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653211002770>
106. Karasi JC, Dziezuk F, Quennery L, Förster S, Reischl U, Colucci G, et al. High correlation between the Roche COBAS ?? AmpliPrep/COBAS ?? TaqMan ?? HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *J Clin Virol*. 2011;52(3):181–6.
107. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: A comparative study. *J Virol Methods*. 2011;173(2):399–402.
108. Assays ARH-PCR, Sire J, Vray M, Merzouk M, Plantier J-C, Pavie J, et al. Comparative RNA Quantification of HIV-1 Group M and Non-M With the Roche Cobas AmpliPrep / Cobas TaqMan. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(3):239–43.
109. Rensburg EJ Van, Tait K, Watt A, Schall R, Rensburg EJ Van, Tait K, et al. Comparative Evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep / Cobas TaqMan HIV-1 Version 2 Test Using the TaqMan 48 Analyzer and the Abbott RealTime HIV-1 Assay Comparative Evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep / Cobas TaqMan HIV-1 Version 2 Test Using the Ta. 2011;2–5.
110. Luft LMAM, Gill MJ, Church DL. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: Review of current platforms. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2011 [citado 16 de fevereiro de 2017];15(10):e661–70. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.013>

ARTIGO

Este artigo será submetido à **AIDS**.

Running Head: HIV-1 viral load in cerebrospinal fluid

Word Count:1776

HIV-1 viral load quantification in cerebrospinal fluid: comparison between Abbott m2000rt assay and COBAS TaqMan v2.0

LUZ, B Ana Júlia¹, KOLLING, Carine², PAIVA, M Rodrigo^{3,4}, Aguiar, Rafael,¹ and SPRINZ, Eduardo^{1,2*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

² Infectology Divisions, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brasil.

³ Molecular Biology Divisions, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

*Adress Correspondence:

Eduardo Sprinz

Serviço de Infectologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: 55 51 3359 8000

E-mail: eduardo.sprinz@gmail.com

ABSTRACT

Objective: Although there is no standardized method to detect HIV in cerebrospinal fluid so far, the PCR COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®48 HIV-1, version 2 (Roche Diagnostic Systems - COBAS v2.0) is widely used. The objective of this study was to compare tests performances Abbott RealTime m2000 HIV-1 (m2000rt) with COBAS v2.0.

Design: The study was designed to compare methods.

Settings: This study took place at the outpatient clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, between May 2015 and July 2016.

Subjects: Patients older than 18 years, who had a clinical indication for cerebrospinal fluid examination, were consecutively enrolled.

Intervention: Assays were processed according to the methodology proposed for use in plasma samples. Small modifications were necessary in the m2000rt assay to neutralize methodological differences: the freezing of samples was performed at -20°C until the time of analysis.

Main outcome measure(s): Equivalence of HIV-1 quantification in cerebrospinal fluid between the two methods.

Results: A total of 37 specimens were collected. Two were excluded due to technical problems. There was a 0.22 log₁₀ copies/mL mean difference between the methods. The results showed a high correlation (r=0.940) between the methods. Kappa index yielded a good agreement between methods (0.648; p<0.001).

Conclusions: The modified m2000rt assay demonstrated to be as effective as the COBAS v2.0 in detecting HIV-1 in cerebrospinal fluid. Therefore, we conclude that this assay can be used as an alternative test in this situation.

Introduction

Combined antiretroviral therapy (cART) has altered the prognosis of people living with HIV/AIDS through the efficient control of systemic viral replication.(1–5), due to the restricted penetration of antiretroviral (ART) in the central nervous system (CNS), there can be compartmentalization of the infection in this site.(6–11) This fact might lead to the continuous viral replication and its consequences, the chance of viral escape to the bloodstream and the selection of viral resistance in the cerebral compartment and even in the plasma.(6,12–16)

In this way, CNS could be characterized as a potential reservoir of HIV as its genetical evolution differs from the ones found in lymphoid tissue.(17–21) Therefore, the identification of continuous viral replication in the CNS is of vital importance for implementing treatment strategies that prevent CNS viral escape and its neurological and/or systemic consequences.

In February 2008, the COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan® 48 HIV-1, version 2; Roche Diagnostic Systems (COBAS v2.0) was introduced by Roche to replace the previous assay in the quantification of HIV viral load in human plasma.(22–24) Although this method has been validated to be used with human cerebrospinal fluid (CSF) samples, it has been worldwide used to detect HIV viral load in the CNS.(25,26) However, this assay has not yet been validated and its costs can be limitation in several regions of the planet. (27)

On the other hand, in many parts of the world the Abbott m2000 *RealTime* HIV-1 (m2000rt) is most utilized. Since 2013, the Brazilian Ministry of Health has implemented this assay as the standard test for testing HIV viral load in blood samples. (28) The objective of this study was to compare m2000rt and COBAS v2.0 tests performances when considering viral load detection in CSF, although none of them have been validated.

Methods

Study Population and setting

This study took place at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a tertiary referral hospital center located in Rio Grande do Sul, the southernmost state in Brazil. Patients older than 18 years of age were consecutively enrolled between May 2015 and July 2016, if they had a clinical indication for lumbar puncture procedure. Subjects with a life expectancy of presumably less than one year and pregnant women were excluded.

The study was approved by the HCPA Ethics Review Board (CAAE: 35072214.7.0000.5327).

Sample Collection, Preparation and HIV viral load in Cerebrospinal Fluid

CSF samples were collected by lumbar puncture and divided into Eppendorf tubes which were numbered and processed according to the methodology proposed by the manufacturer for utilization with plasma samples. (23,28) To neutralize any methodological difference and avoid measurement errors, the freezing of samples was performed at -20°C until the time of analysis.

Abbott RealTime m2000 HIV-1 assay (28)

The m2000rt method is an in vitro assay of the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for quantification of HIV-1 in plasma. The Abbott m2000sp instrument prepares the samples and, after sealing manually, the rack is ready to be transferred to the m2000rt. Results of the assay can be seen in copies/mL (cp/mL), \log_{10} cp/mL, and in international units (IU/mL), or \log_{10} IU/mL; (1 IU = 0.58 copies, 1 copy = 1.74 IU).

This assay allows the use of 4 different sample volumes: 0.2 mL, 0.5 mL, 0.6 mL and 1.0 mL. If using a 0.6 mL sample volume, there is a linear range of 40 – 10.000.000 cp/mL ($1.6 \log_{10}$ cp/mL - $7.0 \log_{10}$ cp/mL). The assay specificity is 100% (CI 95%; 99.28 - 100%). Sensitivity for this sample volume is of 100%, with a detection limit of 40 cp/mL.

COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® 48 HIV-1, version 2; Roche Diagnostic Systems assay (23)

The COBAS v2.0 method is a totally automated specimen processing *in vitro* assay on nucleic acid amplification. Samples are prepared with a COBAS® AmpliPrep equipment. An automated preparation of sample is carried out initially with 1 mL of the patient serum, of which, 850 µL were processed and transferred to a COBAS® TaqMan® 48 Analyzer.

The linear range of this assay is 20 – 10.000.000 cp/mL ($33 - 1.67 \times 10^7$ IU/mL). A copy of HIV-1 RNA is equivalent to 1.67 IU. The conversion factor between HIV-1 RNA cp/mL and IU/mL is 0.6 cp/IU (1.67 UI/cp). The limit of detection, is 20 cp/mL or $1.30 \log_{10}$ cp/mL. The clinical specificity is 99.3% (CI 95%; 98.2% - 99.8%) and its sensitivity 100.0% (99.1% - 100.0%).

Statistical Analysis

Sample size calculation was based in a pilot trial (data not shown) that revealed that a minimum of 37 samples would be needed, to detect a difference of 0.20 \log_{10} (SD 1.62 \log_{10} for COBAS v2.0 and SD 1.69 \log_{10} for m2000rt), correlation coefficient of 0.979, with 90% power. This equation would allow a 10% lost.

The statistical analysis was performed by the computer program SPSS (version 19.0). Even though there no standard test for quantifying viral load in CSF, the COBAS v2.0 was used as a reference, since it is the most widely utilized method. (25,26) Quantitative analyzes

were performed with results that were within the linear range in both methods (n=18). To make the methods comparable, the detection limit of the m2000rt assay for both (40 cp/mL or $1.60 \log_{10}$ cp/mL) was adopted. Results below limit of detection (BLD) were presented as a categorical variable, since they are not quantifiable.

Pearson correlation coefficient was used to compare methods. The normality of the variables was then summarized by calculating the bias estimated by the mean difference “*d*” and the SD of the differences performed by t test for paired samples. Based on the lack of normality of the methods, the degree of agreement of the HIV viral loads results were analyzed by Kappa index. HIV viral load measures were categorized according to Abbott’s method sensitivity and to HIV viral load detection cycles. Specimens were divided into detectable and undetectable (refers to BLD). The first category included samples with quantifiable levels of HIV within the quantification linear range, and the latter included samples which had unquantifiable levels of HIV, including, as well, samples that were out of the linear range ($40-10^7$ cp/mL or $1.60 - 7.0 \log_{10}$ cp/mL).

Results

Thirty-seven specimens were collected and 35 were considered eligible for analysis. Two specimens were excluded, one due to freezing problems, and the other due to an error presented during the processing of the sample by COBAS v2.0 assay as “invalid result probably due to the presence of inhibitors in the sample”. The average viral load (\log_{10} cp/mL) of obtained by the Roche method was 3.66 ± 0.91 ($n=18$), while by the Abbott method was 3.44 ± 1.07 ($n=18$). Table 1 shows all values found for each sample in both methods ($n=35$). Two samples that fit the <lower limit of quantification category when tested by COBAS v2.0 method were undetectable by m2000rt assay.

In the dichotomous analysis (detectable versus undetectable or BLQ), Kappa demonstrated a good agreement (0.648; SE=0.127; $p<0.001$). Agreement between methods occurred with 29 specimens (77%) in the two categories: detectable (18 samples) and undetectable (11 samples). There was a lack of agreement in 6 specimens: 5 were BLD for HIV by the m2000rt and 1 was BLD by the COBAS v2.0 method. Using the COBAS v2.0 as reference, 72% of the samples (18/23) agreed with the other method in the detectable category, the same way that in the undetectable there was an agreement of 90% (11/12), as seen in Table 2.

A high correlation was showed between methods in HIV viral load quantification ($r=0.940$; $p<0.01$; $n=18$) (Figure 1). The t test for paired samples generated an average difference of $0.22 \log_{10}$ cp/mL ($p=0.025$; 95% CI = 0.032–0.408).

Discussion

To our knowledge this is the first study that shows an important agreement and correlation between the methods for HIV-1 viral load quantification in CSF. Through the comparison between two real-time PCR methods to measure HIV CSF viral load, we have found an agreement between the methods in the dichotomous analysis (detectable versus undetectable or BLQ), and a high correlation in their quantified HIV viral load levels using the COBAS v2.0 as a reference method. Therefore, the m2000rt could be considered an alternative method to COBAS v2.0 in that situation.

Our results have shown that both methods agreed with the distribution of samples among the categories. The agreement rate between assays was 77%, which reflects that our findings were not randomly achieved. Nevertheless, two samples that fit the <lower limit of quantification category when tested by COBAS v2.0 method ($20 \log_{10}$ cp/mL) were undetectable by m2000rt assay. This sensitivity disagreement could be resulted from the differences between methods, as the limits of detection differ among assays, and the presence or lack of viraemia could influence the agreement rates. Furthermore, there were 5 specimens that were detectable only by the reference method and only one was solely detectable by the m2000rt assay. This might reflect the higher sensitivity of the reference method.

The study has some weakness as the t test for paired samples revealed statistical significance in differences between the methods ($0.22 \log_{10}$). However, from a clinical point of view, according to the WHO International Standard, only a difference above $0.5 \log_{10}$ cp/mL is considered significant.(29) Variations that occur are accepted due to a difference in the methodologies, as for instance, divergence in sample volumes used in each assay. Moreover, if the same analysis were repeated with the same specimen and with the same

instrument disagreements might have happened, although they are not considered to be clinically relevant. (29)

It is also essential to realize that the appropriate technology should also be selected based on the cost and the expertise available. CSF HIV viral load has not been routinely monitored due to its complexity, and in some areas due to restrained sources. In this context, the m2000rt assay could make it easier to be done in certain circumstances, as for instance, in Brazil it is widely used with a lower cost as compared to the COBAS method.(28) This will help to identify situations in which the CNS works as a sanctuary, an HIV reservoir that could perpetuate the infection or a place for resistance to be developed.

In conclusion, the m2000rt could be considered an alternative method to COBAS v2.0 to measure HIV CSF viral load. The results found in our study showed good agreement and correlation between methods. The modified m2000rt test displayed similarities to the assay most used in literature (COBAS v2.0).(25,26) We suggest, mainly in regions that this method is readily available, with an acceptable cost-benefit ratio, that the m2000rt exam should be performed. Our findings should enable to more easily quantify HIV in CSF, with similar results, and at lower costs in certain places of the world.

REFERENCES

1. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J virus Erad.* 2015;1(2):59–66.
2. Sáez-Ciri3n A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 2013;9(3).
3. Chun T-W, Moir S, Fauci AS. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nat Immunol.* 2015;16(6):584–9.
4. Yilmaz A, Price RW, Spudich S, Fuchs D, Hagberg L, Gissl3n M. Persistent intrathecal immune activation in HIV-1-infected individuals on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;47(2):168–73.
5. Price RW, Peterson J, Fuchs D, Angel TE, Zetterberg H, Hagberg L, et al. Approach to cerebrospinal fluid (CSF) biomarker discovery and evaluation in HIV infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(5):1147–58.
6. Canestri A, Lescure FF-X, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, Marcelin AGG, et al. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):773–8.
7. Ed3n A, Fuchs D, Hagberg L, Nilsson S, Spudich S, Svennerholm B, et al. HIV-1 Viral Escape in Cerebrospinal Fluid of Subjects on Suppressive Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1819–25.
8. Gisolf EH, Enting RH, Jurriaans S, de Wolf F, van der Ende ME, Hoetelmans RM, et al. Cerebrospinal fluid HIV-1 RNA during treatment with ritonavir/saquinavir or

- ritonavir/saquinavir/stavudine. *AIDS*. 2000;14(11):1583–9.
9. Cusini A, Vernazza PL, Yerly S, Decosterd L a, Ledergerber B, Fux C a, et al. Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;62(1):28–35.
 10. Letendre S, Marquie-beck J, Capparelli E, Best B, Mccutchan JA, Morgello S, et al. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness Rank for Quantifying Antiretroviral Penetration Into the Central Nervous System. 2008;65(1):65–70.
 11. Clifford DB. Viral escape in cerebrospinal fluid--an achilles heel of HIV therapy? *J Infect Dis*. 2010;202(12):1768–9.
 12. Joseph SB, Arrildt KT, Sturdevant CB, Swanstrom R. HIV-1 target cells in the CNS. *J Neurovirol*. 2014;21(3):276–89.
 13. Peluso MJ, Ferretti F, Peterson J, Lee E, Fuchs D, Boschini A, et al. Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral load. *AIDS*. 2012;26(14):1765–74.
 14. Dahl V, Gisslen M. An example of genetically distinct HIV-1 variants in cerebrospinal fluid and plasma during suppressive therapy. *J Infect Dis*. 2013.
 15. Dahl V, Peterson J, Fuchs D, Gisslen M, Palmer S, Price RW. Low levels of HIV-1 RNA detected in the cerebrospinal fluid after up to 10 years of suppressive therapy are associated with local immune activation. *AIDS*. 2014;28(15):2251–8.
 16. Lescure FX, Moulignier A, Savatovsky J, Amiel C, Carcelain G, Molina JM, et al. CD8 encephalitis in HIV-infected patients receiving cART: A treatable entity. *Clin Infect Dis*. 2013;57(1):101–8.
 17. Ritola K, Robertson K, Fiscus S a, Hall C, Swanstrom R. Increased human

- immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env compartmentalization in the presence of HIV-1-associated dementia. *J Virol*. 2005;79(16):10830–4.
18. Carvalhal AS, Belmonte-Abreu P, Correa J, Goldani LZ, Rourke SB. Evaluation of Neuropsychological Performance of HIV-Infected Patients with Minor Motor Cognitive Dysfunction Treated with Highly Active Antiretroviral Therapy. *Infection*. 2006;34(6):357–60.
 19. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity*. 2012;37(3):377–88.
 20. Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, et al. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol*. 2003;77(9):5540–6.
 21. Le Douce V, Herbein G, Rohr O, Schwartz C. Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*. 2010;7:32.
 22. Stephan C, Hill A, Hadacek MB, van Delft Y, Moecklinghoff C. Performance of the Abbott RealTime HIV-1 assay versus the Roche Amplicor HIV-1 Monitor™ Test, v1.5, UltraSensitive assay for samples with low plasma HIV-1 RNA copy numbers. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1708–10.
 23. Cobas® TaqMan® HIV-1 Test v2 | Roche Molecular Diagnostics [Internet]. [citado 13 de fevereiro de 2017]. Available at: <https://molecular.roche.com/assays/cobas-taqman-hiv-1-test-v2-for-use-with-the-high-pure-system/>
 24. Molecular Diagnostic Assays | Roche Molecular Diagnostics [Internet]. [citado 13 de janeiro de 2017]. Available at: <https://molecular.roche.com/solutions/assays/>
 25. Béguelin C, Vázquez M, Bertschi M, Yerly S, de Jong D, Rauch A, et al. Viral escape in the CNS with multidrug-resistant HIV-1. *J Int AIDS Soc*. 2014;17(4 Suppl 3):19745.
 26. Delille CA, Pruett ST, Marconi VC, Lennox JL, Armstrong WS, Arrendale RF, et al.

- Effect of protein binding on unbound atazanavir and darunavir cerebrospinal fluid concentrations. *J Clin Pharmacol*. 2014;54(9):1063–71.
27. Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS*. 2011;25(7):885–97.
 28. RealTime HIV-1 Viral Load Assay | Abbott Molecular [Internet]. [citado 13 de janeiro de 2017]. Available at: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/realtime-hiv-1-viral-load>
 29. Arg M, Tietjen I, Gatonye T, Ngwenya BN, Namushe A, Simonambanga S, et al. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents Developed by the DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults. *J Ethnopharmacol*. 2016;5(January):512–3.

Table 1: HIV viral load results by Abbott m2000 RealTime and COBAS TaqMan v2.0 (log₁₀ cp/mL)

Sample	Abbott m2000rt (log ₁₀ cp/mL)	COBAS v2.0 (log ₁₀ cp/mL)
1	4.02	4.19
2	3.20	3.11
3	2.71	2.79
4	3.03	2.92
5	2.67	3.35
6	4.73	4.52
7	4.73	4.62
8	BLQ	2.29
9	2.14	2.99
10	BLQ (U)	BLQ (U)
11	5.21	5.40
12	BLQ (U)	BLQ (U)
13	2.74	3.21
14	5.01	4.95
15	2.93	2.72
16	BLQ (U)	BLQ
17	4.44	4.60
18	1.68	BLQ (U)
19	BLQ (U)	BLQ (U)
20	BLQ (U)	BLQ (1.35)
21	BLQ (U)	1.78
22	BLQ (U)	BLQ (U)
23	BLQ (U)	BLQ (U)
24	1.75	2.48
25	BLQ (U)	1.62
26	BLQ	1.80
27	4.20	4.58
28	2.79	3.61
29	2.14	2.64
30	BLQ (U)	BLQ
31	3.55	3.27
32	BLQ (U)	1.95
33	BLQ (U)	BLQ (U)
34	BLQ (U)	BLQ (1.54)
35	BLQ (U)	BLQ (U)

*U refers to undetectable; bellow detection limit (BLQ) is 1.60 log₁₀ cp/mL. BLQ (U): individuals with undetectable HIV viral load in CSF; BLQ: detectable below detection limit; samples that were detectable by COBAS v2.0 method (detection limit is 1.30 log₁₀ cp/mL) but below detection limit of Abbott method (1.60 log₁₀ cp/mL).

Table 2: Distribution of HIV viral load to detectable and undetectable (bellow limit of detection) results by Abbott m2000 RealTime and COBAS TaqMan v2.0

	Detectable	Undetectable (BLQ)^a	Total
Abbott m2000 RealTime	19 (54%)	16 (46%)	35
COBAS TaqMan v2.0	23 (66%)	12 (34%)	35
Total	42	28	70
Prevalence of Abbott m2000rt results	45,2%	57,1%	OR = 0.792

a. BLQ: bellow limit of quantification.

Figure 1: Correlation between Abbott m2000 RealTime and COBAS TaqMan v2.0 methods on HIV viral load quantification in cerebrospinal fluid.

