

## ANEXO No 5: CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DE LA CARGA VIRAL Y DEL RECuento DE CD4

### Características Técnicas de la Carga Viral:

Parámetros	Amplicor HIV1 Monitor (PCR)	NASBA HIV1 RNA QT (NASBA)	Quantiplex HIV RNA v2 (bDNA)
Método aplicado	RT-PCR	Amplificación isotérmica del ARN	Amplificación de la señal por hibridación molecular
Límite bajo de Sensibilidad (copias)	Aprox. 40 copias/ml	40-80 copias/ml	50 copias/ml
Reproducibilidad (coeficiente de variación)			
Intraprueba	3.5 - 28%	< 0.3 log	12 - 25%
Interensayo	9 - 45%	< 0.15 log	17 - 39%
Interlaboratorio	18 - 43%	< 0.3 log	
Interlote		< 0.15 log	
Detección de los subtipos de VIH del grupo M	A – G	A – G	A – G
Control de calidad interno (estandar de RNA)	Sí (uno por cada determinación)	Sí (tres por cada determinación)	Sí (cuatro por cada serie)
Controles del reactivo	Sí (control positivo alto, positivo bajo y negativo)	Sí (control positivo)	Sí (control positivo alto, positivo bajo y negativo)

**NOTA:** Debido a las variaciones que existen entre las tres técnicas, para poder comparar resultados en el tiempo se debe utilizar la misma técnica en cada paciente. Los resultados por RT-PCR son en general dos veces superiores a los obtenidos por bDNA.

Cambios  $\leq$  a 0.3 log pueden ser justificados por variaciones técnicas; cambios  $\geq$  a 0.5 log reflejan cambios reales de la carga viral.

## Condiciones de conservación y transporte de las muestras para carga viral\*\*

Parámetros	Amplicor HIV1 Monitor (PCR)	NASBA HIV1 RNA QT (NASBA)	Quantiplex HIV RNA v2 (bDNA)
Anticoagulante	EDTA, citrato	EDTA, citrato, heparina	EDTA
Tiempo máximo de sangre completa sin separar el plasma a T° (18 - 22° C)	6 horas	4 horas	4 horas
Tiempo máximo del plasma a 4- 8° C (refrigerador)	24 horas	2 - 4 horas sin tampón de lisis 24 horas en tampón de lisis	30 minutos
Tiempo máximo del plasma a - 20° C (congelador)	7 días	Meses en tampón de lisis	72 horas
Tiempo máximo del plasma a - 80° C (criocongelador)	Meses	Meses en tampón de lisis	Meses
Congelar/descong. plasma almacenado	2 veces máximo	No se recomienda este proceso	No se recomienda este proceso
Transporte del plasma:			
T° ambiente	No	No	No
Refrigerado( 8 -10° C)	Sí	Sí	Sí
Congelado (-20°C) en hielo seco	Sí	Sí	Sí

**NOTA IMPORTANTE:** \*\* las condiciones de obtención de la muestra son críticas. Deberá ser recogida en tubos con aspiración por vacío de 10 ml de sangre anticoagulada con EDTA (aunque Amplicor puede funcionar con citrato). El tiempo crítico entre obtención de la sangre completa y la separación del plasma debe ser **entre 2 y 6 horas como máximo**. Cuando la sangre completa debe ser enviada a otro laboratorio para su procesamiento el transporte debe realizarse a temperatura ambiente y en un contenedor de bioseguridad. El transporte de la muestra de sangre completa se debe asegurar que no supera el **tiempo crítico (2 a 6 horas)** en caso contrario la muestra debe ser enviada como plasma. El laboratorio receptor deberá rechazar toda muestra que no llegue en condiciones óptimas

## Condiciones de realización de la Carga Viral

Parámetros	Amplicor HIV1 Monitor (PCR)	NASBA HIV1 RNA QT (NASBA)	Quantiplex HIV RNA v2 (bDNA)
Áreas diferenciadas de trabajo	Tres (reactivos, extracción y amplificación/detección)	Dos (extracción y detección)	Dos (preparación de muestras y amplificación/detección)
Bioseguridad, cabinas de clase II	Sí, en la extracción del RNA	Sí, en la extracción del RNA	Sí, en la preparación de la muestra (centrifugación a alta velocidad)
Concentración de la muestra	No	No	Sí 4 horas (primer día)
Duración de la extracción y amplificación	5 horas	4 horas	18 horas de incubación toda la noche (primer día)
Duración de la detección	2 horas	2 horas	6 horas (segundo día)
Duración completa de la técnica en horas	7 horas	6 horas	30 horas
Duración completa de la técnica en jornadas de trabajo	1	1	2

## Equipo y laboratorio necesarios para Carga Viral

Parámetros	Amplicor HIV1 Monitor (PCR)	NASBA HIV1 RNA QT (NASBA)	Quantiplex HIV RNA v2 (bDNA)
<b>Equipos:</b>			
Termociclador	Sí	No	No
Centrífuga de alta velocidad	No	No	Sí
Cabina de bioseguridad clase II	Sí	Sí	Sí
Congelador a -80°C	Recomendable	Recomendable	Sí
Material infeccioso en KIT	No	No	Sí (virus activo como control)
Muestra con riesgo biológico	Sí	Sí	Sí
Nivel de entrenamiento del personal técnico	Alto	Alto	Alto
Supervisión por facultativo con experiencia en técnicas microbiológicas	Sí	Sí	Sí
Complejidad técnica	Alta	Alta	Alta
Participar en el sistema de control de calidad externo	Muy recomendable	Muy recomendable	Muy recomendable

---

## Condiciones para el CD4

### Condiciones de colección de la muestra:

El anticoagulante a utilizar depende del tiempo que se tiene para procesar la muestra:

- EDTA o citrato si el procesamiento no excede de las 30 horas luego de la colección de la muestra. El EDTA no se debe usar cuando va a tardar más de ese tiempo porque la población de linfocitos presenta cambios luego de este período.
- ACD o heparina si los especímenes serán procesados dentro de las 48 horas siguientes a la toma de la muestra.

**NOTA:** Luego de 48 horas no se debe procesar ninguna muestra y se requiere otra toma diferente.

- Tome 2 tubos separados marcándolos adecuadamente con la información del paciente (identificación con aseguramiento de confidencialidad, medicaciones que está tomando y condiciones clínicas que pueden afectar el resultado).

### Condiciones de transporte

- Transportar las muestras a T° ambiente evitando T° extremas (T° mayores a 37° causan destrucción celular y alteran el resultado del examen). El impacto de las temperaturas inferiores a 4° no es claro, por lo que es mejor evitarlas.
- Transportar las muestras tan rápido como sea posible pero **antes de las 48 horas** de procesamiento crítico.
- Deben establecerse guías locales de transporte de muestras que aseguren su calidad siguiendo las especificaciones internacionales.

### Integridad de los especímenes:

Inspeccionar el tubo **inmediatamente al recibirse**.

Tomar correcciones inmediatas si sucede lo siguiente;

- Si el espécimen está frío o caliente pero no hay evidencia de hemólisis o congelamiento, procesarlo pero anotando las condiciones en que fue recibido.
- Si la sangre está hemolizada o congelada descartar la muestra y solicitar nueva.
- Si el tubo está roto descartar la muestra y solicitar una nueva.
- Si el espécimen tiene más de 48 horas, descartarlo y solicitar nueva muestra.

Para mayor información se puede consultar el MMWR, Recomendaciones y Reportes, enero 10 de 1997, volumen 46.